

Biochemisches Institut der Universität Zürich
Direktion: Prof. Dr. J.H.R. Kägi

Eine neue Methode zum direkten Nachweis eines Epitopes auf einem Proteinantigen

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Universität Zürich

vorgelegt von
ANDRÉ PIERRE BURNENS
von Oulens-sous-Echallens (VD)

Genehmigt auf Antrag von Prof. Dr. H.R. Bosshard

Zürich 1986
Zentralstelle der Studentenschaft



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41507228_0049

Biochemisches Institut der Universität Zürich
Direktion: Prof. Dr. J.H.R. Kägi

Eine neue Methode zum direkten Nachweis eines Epitopes auf einem Proteinantigen

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Universität Zürich

vorgelegt von
ANDRÉ PIERRE BURNENS
von Oulens-sous-Echallens (VD)

Genehmigt auf Antrag von Prof. Dr. H.R. Bosshard

Zürich 1986
Zentralstelle der Studentenschaft

DANK

An dieser Stelle danke ich ganz herzlich:

Herrn Prof. H.R. Bosshard für die Unterstützung der Idee, die Hilfe während des Projektes und die Mitarbeit bei der Vorbereitung der Publikation, Herrn Prof. H. Binz für die Hilfe bei der Herstellung monoklonaler Antikörper und die grosszügige Unterstützung mit Material, den Herren Dr. G. Corradin und St. Demotz für das Hybrid 2.61 und die fachliche Beratung, Herrn Th. M. Schaumann für die Herstellung von Stereobildern des Cytochroms c, Herrn B. Michel für die Mithilfe bei der Herstellung der Abbildungen, Frau E. Huf und Frau L. Braun für fachliche Unterstützung, die Untersuchung der thermolytischen Fragmente von Cytochrom c und die Herstellung der Abbildung 13, Frau Dr. M. Keck für die isoelektrische Fokussierung des Antikörpers AG 46-48, sowie allen Kolleginnen, Kollegen und meiner Frau, welche mir ihre Zeit und Mühe geschenkt haben.

INHALTSVERZEICHNIS

Zusammenfassung	1
Einführung	3
Produktion und Reinigung von monoklonalen Antikörpern gegen Cytochrom c	5
1. Theorie	5
2. Methoden und Experimente	9
2.1. Reinigung von Cytochrom c	9
2.2. Immunisieren der Versuchstiere	10
2.3. Radioimmunoassays	11
2.3.1. Das Markieren der Proteine mit ^{125}Jod	11
2.3.2. Solid-phase Radioimmunoassay	11
2.3.3. Farr-Radioimmunoassay	12
2.4. Zellfusion und Zellkulturtechnik	13
2.5. Einfrieren und Auftauen von Zellen	14
2.6. Hybridome und Aszitesproduktion	15
2.7. Isolierung der Antikörper	16
2.7.1. Affinitätssäule	16
2.7.2. Antikörper 2.61	17
2.7.3. Antikörper AG46-48	17
2.7.4. Antikörper DB68-5	18
2.8. Diverse weitere Verfahren	18
2.8.1. Isoelektrische Fokussierung	18
2.8.2. F_{ab} -Fragmente	18
2.8.3. Immunelektrophorese	19
3. Resultate	20
3.1. Der Radioimmunoassay	20
3.2. Immunantwort und Fusionen	21
3.3. Die Hybride und deren Antikörper	22

3.4. F _{ab} -Fragmente	24
4. Diskussion	24
Lokalisieren der Bindungsstelle von Antikörper 2.61 auf Cytochrom c	29
1. Theorie	29
2. Material und Methoden	33
2.1. Differentielle Modifikation	33
2.2. Der interne Standard	34
2.3. Herstellung von ¹⁴ C-acetyliertem Cytochrom c	35
2.4. Vollständige Acetylierung von Cytochrom c und Hydroxylamin-Behandlung	35
2.5. Herstellung der Peptide und ihre Trennung	36
2.6. Aminosäurenanalyse der Peptide	37
2.7. Edmann Abbau der isolierten Peptide	37
2.8. Diverse weitere Verfahren	38
2.8.1. SDS-PAGE	38
2.8.2. Oligomerisieren von Cytochrom c mit Glutaraldehyd	38
2.8.3. CNBr-Fragmente von Cytochrom c	39
2.8.4. Apo-Cytochrom c	39
2.8.5. Ninhydrinreaktion	40
2.9. Messung der Radioaktivität	41
3. Resultate	42
3.1. Affinitätsbestimmungen	42
3.2. Kreuzreaktionen von 2.61 mit Cytochrom c verschiedener Spezies	43
3.3. Differentielle Modifikation	44
3.4. Totale Acetylierung	45
3.5. Radioaktivitätsmessung	46
3.6. R-Werte	46
4. Diskussion	47

Schlussfolgerungen	53
Literatur	55
Bezugsquellennachweis, Abkürzungen, Abbildungen und Tabellen	67
1. Abkürzungen	67
2. Bezugsquellennachweis	69
3. Abbildungen	74
4. Tabellen	87

Zusammenfassung

Die Untersuchung von Antigen-Antikörperinteraktionen bei Proteinantigenen ist relativ wenig erforscht, weil man erst seit etwa zehn Jahren Antikörper gegebener Spezifität in grossen Mengen herstellen kann. Da bestehende Methoden nur indirekte Schlüsse über die Lokalisation der Epitope zulassen, versuchten wir, die differentielle Modifikation, die eine genauere Aussage erlaubt, für diese Fragestellung einzusetzen.

Die differentielle chemische Modifikation wurde für die Charakterisierung der Bindungsstellen an Redoxenzymen entwickelt und an diesem System auch ausführlich getestet. Die differentielle chemische Modifikation erlaubt es, die Reaktivität von Aminosäureseitenketten am intakten Protein unter verschiedenen Bedingungen quantitativ zu bestimmen. Lokalisatorische Hinweise ergeben sich aus der Tatsache, dass Reste an der Kontaktfläche zweier Proteine aus verschiedenen Gründen im allgemeinen eine verminderte Reaktivität aufweisen.

In einem ersten Teil der Arbeit wurden monoklonale Antikörper gegen Cytochrom c hergestellt. Dann wurde mit dem IgG-Antikörper 2.61 die differentielle Modifikation vorgenommen. Damit ist es uns gelungen, nicht nur das Epitop zu lokalisieren, sondern auch nachzuweisen, dass es sich wahrscheinlich um eine diskontinuierliche antigene Determinante handelt. Diskontinuierliche Epitope umfassen Reste, welche in der Sequenz des Proteins weit entfernt liegen und erst durch die dreidimensionale Faltung der Polypeptidkette zusammengebracht werden.

Dies ist der erste direkte Nachweis einer nicht-sequentiellen Determinante auf Cytochrom c überhaupt; das Epitop ist auf der dem Haem abgewandten Molekülseite lokalisiert und beinhaltet die Lysinreste 60 und 99.

Bindungsstudien mit Cytochrom c verschiedener Spezies weisen ferner auf eine Beteiligung von Glu 92 als spezifitätsbestimmenden Rest hin.

Einführung

Die Grösse der Antigenbindungsstelle eines Antikörpers wird auf $20 \times 15 \times 12$ Å geschätzt (1). Ein Epitop umfasst also die Seitenketten von etwa 6 Aminosäureresten einer Polypeptidkette. Somit liegen auf einem Protein von 200 Aminosäureresten, von denen etwa die Hälfte dem Lösungsmittel zugekehrt sind, mindestens einige Hundert Epitope. Verschiedene Beobachtungen sprechen dafür, dass durch Immunisierung mit ausgewählten Peptiden und mit gewissen Kunstgriffen praktisch gegen alle diese Epitope Antikörper erzeugt werden können. Ein erstaunlich grosser Prozentsatz dieser Antikörper bindet das Protein mit guter Affinität (2, 3).

Man darf aber in diesem Zusammenhang nicht vergessen, dass Bindung ein relativ unspezifisches Phänomen darstellt. In vivo müssen die Antikörper, sollen sie ihre Abwehrfunktion erfüllen, offensichtlich gewisse weitere Eigenschaften mitbringen; deshalb schützt beispielsweise nur ein Teil von antiviralen Antikörpern den Organismus wirksam vor einer weiteren Virusinvasion (4, 5). Es ist denkbar, dass dabei der Wahl des Epitopes eine entscheidende Bedeutung zukommt.

Jedenfalls kann die Immunisierung mit gewissen Peptidteilen eines komplexen Antigens offensichtlich sogar eine Immunsuppression zur Folge haben (6). Dazu kommt, dass der Organismus auch bei der möglichen Vielzahl der Epitope bei jedem Individuum nur gegen eine kleine Auswahl von Spezifitäten überhaupt reagiert (7, 8). Um diese Phänomene genauer zu verstehen, muss man eine Möglichkeit haben, Epitope rasch, bequem und genau zu lokalisieren, denn nur wenn eine grosse Zahl von Antikörperbindungsstellen auf mehreren Proteinen bekannt ist, lassen sich Regeln ableiten, nach denen die genannte Auswahl getroffen wird.

Dies ist vor allem auch im Hinblick auf die Entwicklung von Impfstoffen auf der Basis von definierten Peptidantigenen von Bedeutung (9). Die genaue Kenntnis einer Bindungsstelle, zusammen mit der Kenntnis der Struktur derselben, erlaubt es ferner, den Antikörper zur Strukturbestimmung an einem neuen, sonst unbekannten Protein oder Peptid anzuwenden (Literatur in 10).

Die differentielle chemische Modifikation misst die chemische Reaktivität von Aminosäureseitenketten am intakten Protein in Lösung (11). Wird das Protein in parallelen Ansätzen in Anwesenheit und Abwesenheit eines Bindungspartners differentiell modifiziert, so werden die Aminosäureseitenketten, die an der Kontaktfläche des Komplexes liegen, in ihrer Reaktivität beeinflusst. Natürlich können auch weiter entfernte Reste in ihrer Reaktivität beeinflusst werden; trotzdem ist es in der Regel möglich, die an der Komplexbildung beteiligten Reste zu erkennen (12).

Zwischen dem Epitop auf dem Antigen und dem komplementären Paratop des Antikörpers besteht eine Kontaktfläche, die sich für ein solches Experiment anbietet. Wir haben gezeigt, dass die differentielle chemische Modifikation die Möglichkeit bietet, mit verhältnismässig bescheidenem Aufwand Epitope direkt zu lokalisieren.

Produktion und Reinigung von monoklonalen Antikörpern gegen Cytochrom c

1. Theorie

Die in der Natur vorkommenden Antigene gehören zumeist zu zwei Klassen von Biomolekülen: Oligosaccharide und Proteine-Peptide (13). Die relativ starre Struktur von Zuckermolekülen und das niedrige Molekulargewicht sowie die geringe strukturelle Komplexität der daraus bestehenden Oligosaccharide gestalten die Untersuchung dieser Antigene relativ einfach. Im Gegensatz dazu können schon relativ kurze Peptide eine Sekundärstruktur aufweisen (14). Zudem bewirkt das Vorkommen von etwa 20 verschiedenen Aminosäuren in Peptiden eine grosse Vielfalt möglicher Primärstrukturen. Die kleinsten natürlich vorkommenden Proteine sind infolge der Anzahl von beteiligten Aminosäureresten noch um Grössenordnungen komplexer, so dass die Untersuchung ihrer antigenen Struktur auf Schwierigkeiten stösst.

Wegen der grossen Bedeutung von Proteinantigenen sind dennoch sehr viele Versuche unternommen worden, ihre Antigenität näher zu erforschen (15). Für diese Untersuchungen wurden bisher die meisten gebräuchlichen proteinchemischen Verfahren angewendet.

Bis 1974 standen für solche Untersuchungen in der Immunologie nur Antiseren zur Verfügung. Dies hatte mehrere Nachteile; insbesondere erlaubte die limitierte Menge an Antikörpern, die in den Seren vorliegt, ausser in Ausnahmefällen keine proteinchemischen Untersuchungen. Ferner ist die Immunglobulinfraction eines Antiserums ein sehr heterogenes Gemisch, in dem Antikörper gegen sehr verschiedene Antigene vorliegen. Selbst innerhalb der Antikörper, die gegen ein definiertes Antigen gerichtet sind - man kann sie zum Beispiel mittels Affinitätsreinigung isolieren - ist ein breites Spektrum an Spezifitäten vertreten. Dies wurde schon mit Haptenen gezeigt (16).

Das spontane Auftreten von Myelomen und die Entdeckung, dass die entartete Zellpopulation klonalen Ursprungs ist und ein einziges Immunglobulin in grossen Mengen herstellt, erlaubte erste grössere Fortschritte in der Charakterisierung der Immunglobuline. Damit war es auch erstmals möglich, die 'eine Zelle - ein Antikörper' Hypothese (17) zu bestätigen. Die Struktur konnte an verschiedenen Myelomproteinen genau bestimmt werden (18, 19, 20). Allerdings hatten die Immunglobuline aus Myelomen einen gewichtigen Nachteil: das Antigen, gegen das sie gerichtet waren, war unbekannt. Die eine Ausnahme, das Myelomprotein new, bindet zwar Hydroxy-Vitamin K mit geringer Affinität, doch ist es zweifelhaft, ob dies wirklich der ursprünglichen in vivo-Spezifität dieses Antikörpers entspricht.

Die epochale Entdeckung von Köhler und Milstein (21), dass Zellhybride zwischen Myelomzellen und B-Zellen eines immunisierten Tieres häufig Antikörper einer einzigen, gezielt wählbaren Spezifität in praktisch unbegrenzter Menge herzustellen vermögen, hat diese Situation grundlegend verändert. Es stehen damit im Prinzip alle denkbaren proteinchemischen und anderen Verfahren zur Untersuchung der Antigen-Antikörperinteraktion offen.

Eine Vorsichtsmassnahme darf dabei allerdings nicht ausser acht gelassen werden. Da im Prinzip alle denkbaren Spezifitäten von Antikörpern, die vom Versuchstier im Augenblick der Zellfusion produziert werden, in vitro selektioniert werden können (22), kommt dem Auswahlverfahren für die Antikörper der entstandenen Hybride eine grosse Bedeutung zu. Erst die Charakterisierung einer ganzen Anzahl monoklonaler Antikörper gegen ein einzelnes Proteinantigen erlaubt Rückschlüsse auf die ursprüngliche Antikörperreaktion des Versuchstieres.

Für die Untersuchung der Bindungsstelle können im Prinzip alle gängigen proteinchemischen Methoden verwendet werden. Dies ist in verschiedenen Arbeitsgruppen zum Teil auch schon vollzogen worden. Die direkteste und genaueste Aussage lässt natürlich die Röntgenstrukturanalyse zu, wenn auch diesbezüglich schon angewendet worden ist, die Struktur im Kristall und in Lösung seien nicht identisch (23). Wahrscheinlich sind die Unter-

schiede aber nicht sehr bedeutend (24). Die Röntgenstruktur kann aber als einzige Methode eine direkte Antwort auf die Frage geben, ob das Antigen von seinem Antikörper deformiert wird, wenn die Struktur des Antigens in unabhängigen Experimenten mit und ohne Bindungspartner analysiert wird. Für eine solche Deformation des Antigens sind zwar einige Hinweise (25, 26), aber noch keine Beweise gefunden worden. Die Methode ist äusserst aufwendig und zeitraubend und verlangt im Gegensatz zu den übrigen Methoden zusätzlich die Kenntnis der Primärstruktur des untersuchten Antikörpers. Eine Arbeitsgruppe befasst sich mit dieser Fragestellung bei monoklonalen Anti-Lysozym-Antikörpern (27).

Die üblicheren biochemischen Methoden zur Untersuchung der Interaktion gehen zum grössten Teil davon aus, die Bindung von verschiedenen Analoga an den Antikörper zu untersuchen. Diese Analoga sind entweder natürliche Verwandte des Proteins aus anderen Spezies oder das von Menschenhand modifizierte Protein, in dem gewisse Reste gegen andere ausgetauscht oder chemisch modifiziert wurden (28, 29, 30). In neuerer Zeit kann die Modifikation auch an der DNA, die ein Protein codiert, vorgenommen und das veränderte Genprodukt *in vitro* exprimiert werden (31). Diese Methoden haben den Vorteil, dass sie bis zu einem gewissen Grade auch mit Antisera angewendet werden können (32, 33).

Die strukturelle Information aus diesen Untersuchungen ist jedoch indirekter Natur, und gegen die Ergebnisse können viele Einwände erhoben werden. Insbesondere kann nie bewiesen werden, dass eine Veränderung, die die Bindung beeinflusst, an der Bindungsstelle stattgefunden hat. So können gewisse Modifikationen auch weit entfernt liegende Proteinteile in ihrer Struktur beeinflussen (34). Die mangelnde Spezifität vieler chemischer Modifikationsreaktionen ist eine zusätzliche Erschwerung der Situation.

Weiter komplizierend wirkt, dass Bindung an sich ein recht unspezifisches Phänomen ist. Während bei der Untersuchung von Enzymen nebst der Bindung des Substrates immer noch eine Aktivität gemessen werden kann, ist dies bei Antikörpern nicht möglich. Die Unterschiede in der Bindung sind meist quantitativ und nicht qualitativ (eine gewisse, wenn auch sehr

schwache oder unspezifische Bindung gibt es immer) und bedürfen deshalb immer einer Interpretation.

Ausgehend von einer völlig andersartigen Beobachtung entwickelten verschiedene Gruppen eine weitere Methode. Zur Isolierung eines Proteins, von dem nur eine Teilsequenz bekannt war, immunisierten die Forscher Versuchstiere mit einem Peptid, das einem Abschnitt dieser Sequenz entsprach. Mit dem Antiserum gelang es ihnen daraufhin, das ganze Protein zu extrahieren (Lit. in 35). Man stellte dann fest, dass ein erstaunlich grosser Anteil von Antikörpern, die gegen Peptidteile eines Proteinantigens erzeugt wurden, auch das native Protein zu binden vermögen. Der offensichtliche Vorteil dieser Methode besteht darin, dass die Antikörper eine bekannte Sequenzspezifität aufweisen, die durch das zur Immunisierung verwendete Peptid gegeben ist. Wenn der Antikörper bindet, weiss man auch, wo er bindet. Dafür tauchen bei diesem Vorgehen neue Fragen auf.

Erstens muss eine Regel gefunden werden, die es erlaubt, vorherzusagen, welche der Anti-Peptid-Antikörper das Gesamtprotein zu binden imstande sind (36, 37). Zweitens können mit dieser Methode nur sequentielle Determinanten erfasst werden. Drittens fand die Gruppe mehrfach, dass ein Antikörper, der das Protein bindet, nicht notwendigerweise auch eine biologische Funktion erfüllt. Nur ein Teil (ca. 30 %) von antiviralen Antikörpern, die durch Immunisierung mit Peptiden erzeugt worden waren, zeigten im Versuchstier eine virusneutralisierende Wirkung (4). Dies ist ein ernüchterndes Resultat, vor allem im Hinblick auf die Entwicklung von Vakzinen auf der Basis von definierten Peptiden. Deshalb wäre es von Vorteil, weitere Untersuchungsmethoden zu Verfügung zu haben, die direkte und möglichst genaue Aussagen zulassen.

Die differentielle chemische Modifikation (vgl. Einleitung und Theorie zum zweiten Teil) ermöglicht die Lokalisation von Proteinkontaktflächen. Die Methode hat sich bei der Untersuchung von Redoxenzymen bewährt. Sie wurde in der vorliegenden Arbeit an einem Antigen-Antikörperkomplex angewendet. Aus methodischen Gründen wurde für diesen ersten Versuch der Verwendung von monoklonalen Antikörpern der Vorzug gegeben.

Dieser Teil beschreibt den Versuch der Herstellung solcher Antikörper gegen Cytochrom c und die Produktion von Antikörper 2.61. Das entsprechende Hybrid wurde uns von St. Demotz aus der Arbeitsgruppe um G. Corradin am Institut de Biochimie de l'Université de Lausanne zur Verwendung überlassen.

Cytochrom c wurde aus verschiedenen praktischen Erwägungen als Modellantigen gewählt. Erstens ist seine Struktur und Antigenität von verschiedenen Gruppen bereits untersucht worden (38 - 41). Zweitens eignet sich Cytochrom c wegen seiner grossen Zahl von Lysinresten, welche alle an der Proteinoberfläche liegen, besonders gut für die differentielle Modifikation. Ein grosser Anteil der Proteinoberfläche kann gewissermassen 'karti-ert' werden. Drittens hat unsere Arbeitsgruppe eine ausgedehnte Erfahrung mit der proteolytischen Spaltung und der Isolierung der entstehenden Peptide bei Cytochrom c.

2. Methoden und Experimente

2.1. Reinigung von Cytochrom c

Die Methode ist bereits beschrieben (42). Etwa 100 mg Cytochrom c aus Pferdeherz, gelöst in 5 ml destilliertem Wasser, wurden durch Zugabe von 3 mg Kaliumferricyanid vollständig oxidiert und auf eine 1.5×55 cm CM 32 - Ionentauschersäule aufgetragen, die nach Werksvorschrift (Whatman, England) in 85 mM Natriumphosphatpuffer pH 7.0 aequilibriert worden war. Die Elution fand bei 4°C mit dem gleichen Puffer statt.

Die desamidierten Formen laufen dabei der Hauptfraktion voraus und werden verworfen. Das Eluat wurde daraufhin durch Ultrafiltration aufkonzentriert und vom Puffer befreit. Aliquots der Lösung wurden bei -20°C eingefroren oder gefriergetrocknet.

2.2. Immunisieren der Versuchstiere

Wir versuchten mit zwei verschiedenen Proteinpräparaten eine Immunisierung zu erzielen.

Für die Immunisierung mit nativem Cytochrom c wurde das Protein (5 mg/ml Lösung) gefällt, indem die Lösung mit dem halben Volumen 1 M NaHCO_3 -Lösung und anschliessend mit dem gleichen Volumen 10 % $\text{KAl(SO}_4)_2 \cdot 10 \text{ H}_2\text{O}$ Lösung bei 4°C versetzt wurde. Der Niederschlag (300 µg Protein) wurde für die Grundimmunisierung anschliessend mit CFA emulgiert. Injections de rappel enthielten pro Dosis 100 µg Protein im Präzipitat und wurden in ICFA emulgiert verabreicht.

Weil Cytochrom c vom Pferd ein bekanntermassen schlechtes Antigen ist (43), versuchten wir Cytochrom c kovalent mit einem immunogenen Trägerprotein zu verknüpfen. Diese Art der Immunisierung wird bei Haptenen und kurzen Peptiden erfolgreich verwendet (44). Als Trägerprotein verwendeten wir Haemocyanin (KLH). Die Kopplung erfolgte nach einer bekannten Vorschrift (45). KLH (6 mg/ml) wurde mit einem gleichen Gewicht Bernsteinsäureanhydrid in 100 mM Natriumphosphatpuffer pH 7 bei Zimmertemperatur gerührt. Der pH wurde dabei mit NaOH konstant gehalten. Das Reaktionsprodukt wurde bei 4 °C gegen Wasser dialysiert und anschliessend lyophilisiert.

Etwa 8 mg succinyliertes KLH und 5 mg Cytochrom c wurden in 2 ml 50 % (v/v) Dioxan in Wasser gelöst. Der pH wurde mit Triethylamin auf 7.5 eingestellt. Die Kopplung erfolgte mit 16 mg EDC, welches als Festkörper zugegeben wurde. Das Reaktionsprodukt war unlöslich. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte mit alkalischer Hydrolyse und Ninhydrinreaktion gegen einen BSA-Standard.

Die Immunisierungen erfolgten mit jeweils 100 µg Proteinkonjugat, emulgiert in CFA beziehungsweise ICFA. Wir immunisierten einerseits Balb/c Mäuse und andererseits Louvine Ratten. Wir verwendeten ausschliesslich weibliche Tiere zur Immunisierung. Die entsprechenden Tierstämme werden am Institut für Immunologie gezüchtet und gehalten.

Die Injektionen erfolgten im Etherrausch subcutan in die Bauchhaut der Tiere. Die erste Booster-Impfung erfolgte 14 Tage nach der Grundimmunisierung. Weitere Injektionen wurden in wöchentlichen Abständen wiederholt, bis die Tiere einen Titer von mindestens 1:80 aufwiesen. Die Blutentnahmen erfolgten durch Herzpunktion am anästhesierten Tier. Die Bestimmung der Titer erfolgte im Radioimmunoassay.

2.3. Radioimmunoassays

2.3.1. Das Markieren der Proteine mit ^{125}Jod

Die Methode ist bereits beschrieben (46). 100 μg Protein (etwa 6 mg/ml) wurden mit 1 mCi NaJ in 10 μl Lösung und 1 mg/ml Chloramin T in PBS versetzt. Nach 60 sec Inkubation wurden 25 μl Natriumdisulfidlösung (1 mg/ml in PBS) zugegeben und die Mischung sofort über Sephadex G-25 getrennt. Eluiert wurde mit 0.1 % BSA-PBS. Die Proteinfraction wurde gesammelt und in 25 μl Aliquots bei -20°C eingefroren. Typische spezifische Aktivität etwa 7×10^6 cpm/ μg .

2.3.2. Solid-phase Radioimmunoassay

In jedes Loch einer 96-Loch-Rundboden-Mikrotiterplatte wurde 1 μg Cytochrom c in 25 μl PBS pipettiert. Die Platten wurden anschliessend mindestens 20 Minuten bei Raumtemperatur, typischerweise aber über Nacht bei 4°C inkubiert. Dann wurden die Löcher mit 1 % BSA in PBS vollständig aufgefüllt und 1 Stunde bei 37°C inkubiert. In diesem Zustand konnten die Platten mindestens 7 Tage ohne wesentliche Einbusse an Genauigkeit des Tests bei 4°C aufbewahrt werden.

Nach 3-maligem Waschen mit eiskaltem PBS wurden 25 μl Volumen Kulturüberstand oder verdünntes Serum beziehungsweise verdünnter Aszites aufgetragen und 60 Minuten bei 4°C inkubiert. Jedes Loch wurde anschliessend 3 mal mit eiskaltem PBS gewaschen. Für weitere 60 Minuten wurde mit einer 1:500 Verdünnung von Kaninchen-anti-Ratten-IgG Serum in 0.2 % BSA in

PBS bei 4°C inkubiert. Nach weiterem 3-maligem Waschen wurde - wiederum für 1 Stunde - mit ^{125}J -Protein A in 0.2% BSA-PBS inkubiert. Typischerweise verwendeten wir 50000 cpm. Nach 4-maligem Waschen in eiskaltem PBS wurden die Platten schliesslich getrocknet, zerschnitten und die einzelnen Stücke in einem Riagamma 1274 (LKB) Zähler ausgezählt.

Als positive Kontrolle wurde Kulturüberstand von 2.61-Hybrid oder affinitätsgereinigter 2.61-Antikörper in geeigneter Verdunnung verwendet (100 bis 500 ng Antikörperprotein pro Loch). Als negative Kontrolle wurden Antikörper gegen verschiedene Histokompatibilitätsantigene von Maus und Ratte verwendet. Unspezifische Bindung wurde an Platten gemessen, die ohne Cytochrom c inkubiert worden waren.

2.3.3. Farr-Radioimmunoassay

Die Originalvorschrift (47) wurde wie folgt modifiziert. In PVC-Röhrchen mit 5 mm Durchmesser wurden je 25 µl folgender Lösungen in der angegebenen Reihenfolge pipettiert: Pferdenormalserum, unmarkierte Cytochrom c-Lösungen verschiedener Konzentration, ^{125}J -Cytochrom c entsprechend etwa 30000 cpm, 500 ng Antikörper in 25 µl 0.2 % BSA-PBS oder 1:10 bis 1:100 verdünnter Aszites. Die Ansätze werden gründlich gemischt und nach 30 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur mit 100 µl gesättigter Ammoniumsulfatlösung versetzt und damit sofort vermengt. Die Inkubationszeit vor dem Zentrifugationsschritt ist nicht kritisch, beträgt aber aus technischen Gründen etwa 7 bis 10 Minuten. Der Niederschlag wird auf einer Tischzentrifuge hart abzentrifugiert, einmal in halbgesättigter Ammonsulfatlösung resuspendiert, wieder abgetrennt und anschliessend im γ -Counter ausgezählt. Die Ueberstände wurden gesondert gezählt. Die Inhibition der Bindung von ^{125}J -Cytochrom c durch verschiedene unmarkierte Analoge wurde so bestimmt. Unspezifische Fällung wurde ohne Antikörperzugabe ermittelt. Sie beträgt bis maximal 30 % der spezifischen Fällung.

2.4. Zellfusion und Zellkulturtechnik

Die Methode ist bereits im Detail beschrieben (48). Die Milz von immunisierten Tieren wurde jeweils 72 Stunden nach der letzten Impfung am getöteten Tier unter sterilen Kautelen entnommen. In der Annahme, dass durch niedrige Antigenkonzentrationen selektiv Klone hoher Antikörperaffinität stimuliert würden, wurde den Tieren vor der Fusion nur noch 20 µg Antigenprotein verabreicht. Die Milz wurde dann durch ein Stahlsieb gepresst und die Zellen durch Zentrifugieren (5 min; $400 \times g$) gewonnen. Die Erythrozyten wurden durch einen hypotonen Schock lysiert.

Etwa 1.2×10^8 Milzzellen wurden mit 6×10^7 Myelomzellen vom F0-Myelom (48) oder Y3-Myelom (49) vereinigt. Beide Myelome produzieren keine eigenen Immunglobuline mehr. Das Zellpellet wurde dann mit 1 ml 50 % (w/v) PEG 4000 in GKN bei 37 °C aufgeschwemmt, dann wurden 10 ml GKN innert 150 Sekunden langsam zupipettiert und die Mischung während 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschliessend wurde der Ansatz auf 50 ml mit GKN aufgefüllt und bei $250 \times g$ 10 Minuten zentrifugiert.

Das Zellpellet wurde in 120 ml HAT Selektivmedium suspendiert. Aliquots von 100 µl wurden auf 24 Stunden vorinkubierte Rattenmakrophagen in 96-Loch-Flachboden-Mikrotiterplatten pipettiert. Das HAT-Selektivmedium ist IDMEM (vgl. u.), welches zusätzlich 1×10^{-4} M Hypoxanthin, 1.6×10^{-5} M Thymidin und 4×10^{-7} M Aminopterin enthält. Nicht mit somatischen Zellen hybridisierte Myelomzellen sterben in diesem Medium ab. Nicht hybridisierte Milzzellen vermehren sich in Kultur nicht oder nur sehr beschränkt.

Makrophagen wurden dadurch gewonnen, dass die Bauchhöhle einer anästhesierten Ratte mit 20 ml sterilem PBS ausgespült wurde. Die Zellen in der Spülflüssigkeit wurden mit $400 \times g$ während 5 Minuten abzentrifugiert und anschliessend in einer ^{60}Co Anlage mit 3000 rad bestrahlt. Das Zellpellet wurde in HAT-Medium aufgenommen und in Aliquots von 100 µl in 96-Loch-Platten auspipettiert. Die Peritonealzellen einer Ratte genügen für 3 Platten.

Die Kultur aller Zellen erfolgte unter den nachgenannten Bedingungen. Inkubation in Luft mit 5 % CO₂, 95 % relativer Feuchte und 37 °C. Als Medium diente Iscove's modified DMEM (IDMEM) mit Zusatz von 10 % FCS, 5 % NaHCO₃-Lösung (75g/l) und von 1 M Merkaptoethanol in PBS bis zu einer Konzentration von 50 µM unmittelbar vor Gebrauch.

Das Austesten der Kulturüberstände erfolgte mit dem oben erwähnten Radioimmunoassay. Auch etablierte Klone wurden von Zeit zu Zeit getestet, da alle eine gewisse genetische Instabilität aufwiesen. Neue positive Hybride wurden auf Makrophagen in 24-Loch-Platten expandiert. Falls dabei die Kulturüberstände weiterhin positiv waren, wurde das Hybrid durch 'limiting dilution' kloniert.

Dabei wurde eine Verdünnung der Zellsuspension hergestellt und so pipettiert, dass pro Kulturloch 0.3 Zellen zu erwarten waren (Poisson-Verteilung mit $\lambda = 0.3$). Bis zum Anwachsen der Klone wurden die Zellen auf Makrophagen gehalten und das Medium mit 1×10^{-4} M Hypoxanthin sowie 1.6×10^{-5} M Thymidin supplementiert. Sobald die Kulturfläche 12 cm² erreicht hatte, wurden die Zellen ohne Makrophagen in Zellkulturflaschen gehalten und die Kulturfläche wurde bei Wachstum zur Konfluenz jeweils 1:2 expandiert.

Drei ausgewählte Klone wurden so gehalten und vermehrt sowie zur Aszitesproduktion herangezogen. Der Klon 2.61 entstammt der Fusion von SJL-Maus-Milzzellen und dem P3-X63 Ag8.653-Myelom. Das Hybrid wurde von St. Demetz gefunden und uns freundlicherweise zur Verwendung überlassen. Wir haben die Hybride AG46-48 und DB68-5 in unserem Labor aus Lou-Milzzellen und dem F0-Myelom erzeugt.

2.5. Einfrieren und Auftauen von Zellen

Das Einfrieremedium setzte sich zusammen aus 50 % IDMEM, 30 % FCS und 20 % DMSO. Das Medium wurde durch eine 0.45 µm Membran sterilfiltriert. In geeignete Einfriereröhrchen (Cryotubes) wurden auf Eis pipettiert: 0.5 ml

Einfriermedium und 0.5 ml Zellsuspension in IDMEM. Pro Aliquot wurden mindestens 10^6 Zellen eingefroren. Dann wurden die Röhrchen gut verschlossen in eine Styroporschachtel verbracht. Die Isolation soll verhindern, dass die Temperatur beim Einfrieren zu schnell absinkt. Die Schachtel wurde dann für 24 Stunden auf $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gehalten, bevor die Einfriereröhrchen in flüssigen Stickstoff gebracht wurden.

Das Auftauen der Zellen soll möglichst rasch erfolgen. Die Röhrchen wurden im Wasserbad bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ angetaut. Der Inhalt wurde sofort in 10 ml eiskaltes IDMEM verbracht und die Zellen mit $500 \times g$ während 5 Minuten abzentrifugiert. Alles DMSO-haltige Medium wurde entfernt und die Zellen wurden in 2 ml IDMEM resuspendiert. Die Zellen wurden auf 2 Löcher einer 24-Loch-Platte auf vorinkubierte Makrophagen verteilt.

2.6. Hybridome und Aszitesproduktion

Hybridome sind Tumoren, die aus Hybriden in vivo entstehen. Die optimalen Wachstumsbedingungen lassen dabei grosse Mengen Antikörper entstehen. Die Versuchstiere wurden für die Produktion von Hybridomen durch die Injektion von 0.5 ml Pristan i.p. vorbereitet. Dies soll adhärentes Tumorstromawachstum mit Bildung von soliden Tumoren möglichst verhindern.

Da alle verwendeten Hybride für Inzuchtstämme nicht histokompatibel waren, mussten die Träger von Hybridomen vorgängig bestrahlt werden. (AG46-48 und DB68-5 sind Maus×Ratte; 2.61 ist zwar ein Maus×Maus Hybrid, trägt aber die Histokompatibilitätsantigene $H2^s$ von SJL und $H2^d$ des P3-X63/Ag8.653-Myeloms, das ein Balb/c Myelom ist). Ratten sind als Hybridomträger besonders geeignet, weil sie grössere Aszitesmengen produzieren. AG46-48 und DB68-5 wurden deshalb in Ratten gespritzt. Wir verwendeten zumeist männliche Lou-Ratten. Das 2.61-Hybrid vermehrte sich in Ratten nicht und wurde deshalb in DBA/2 Mäusen gehalten.

Die Tiere wurden in einer Anlage bestrahlt, die als Quelle ^{137}Cs und eine Dosisleistung von 123 rad/min besitzt. Mäuse erhielten eine Dosis von

400 rad, Ratten 800 rad. Etwa 10^8 in vitro kultivierte Hybridzellen wurden mit PBS gewaschen, um Rückstände von Kulturmedium zu entfernen, und den Tieren i.p. injiziert.

Nach durchschnittlich 7 bis 10 Tagen hatten die Mäuse bis zu 6 ml und Ratten maximal etwa 20 ml Aszites produziert und wurden über CO_2 getötet. Das Serum dieser Tiere wies einen Titer von bis zu 1000 des entsprechenden Antikörpers auf. Mehrmalige Aszitespunktion in kürzeren Abständen erwies sich als ungeeignet, da die Tiere die Prozedur auch bei sehr sorgfältiger Manipulation nur zum Teil überlebten.

2.7. Isolierung der Antikörper

2.7.1. Affinitätssäule

Das Gelmaterial wurde nach folgender Vorschrift hergestellt. CNBr in destilliertem Wasser (67 mg/ml) wurde mit 1 N NaOH auf pH 11 eingestellt. Ein gleiches Volumen gewaschener (dest. Wasser) Sepharose 4B-CL wurde dazugegeben und die Mischung während 15 Minuten unter NaOH-Zugabe bei konstantem pH gehalten. Das Reagens wurde dann auf einer Nutsche abgesogen und das Gel sofort mit 800 ml eiskaltem Boratpuffer gewaschen. Cytochrom c (71.2 mg) in 50 ml Boratpuffer pH 8.2 (166 mM Borat; 134 mM NaCl) wurde sofort mit 46 ml aktivierter Sepharose 4B-CL versetzt und bei Raumtemperatur durch Kippen während 180 Minuten gemischt. Überzählige Bindungsstellen wurden blockiert durch Inkubation in 0.5 M Ethanolamin pH 8.2 bei Raumtemperatur während 3 Stunden. Adsorbiertes aber nicht kovalent gebundenes Protein wurde durch wiederholtes Waschen mit Lösungen von pH 8.2 (Boratpuffer) und pH 3.5 (100 mM Acetat, 500 mM NaCl) entfernt. Die Kopplungseffizienz betrug etwa 70 %. Mit dem Gelmaterial wurde anschliessend eine Säule von 0.9×20 cm gepackt.

2.7.2. Antikörper 2.61

Aszites wurde zentrifugiert und 1:2 mit PBS verdünnt. Dann wurde die Mischung auf die Affinitätssäule aufgetragen. Nach 60 Minuten Inkubation bei 4°C wurde die Säule mit PBS gespült, bis im Eluat die Absorption bei 280 nm wieder den Grundwert erreicht hatte. Dann wurde Glycin-HCl-Puffer pH 2.8 (330 mM Glycin; 330 mM NaCl) aufgetragen und das gesamte eluierte Protein aufgefangen. Der Antikörper war gemäss SDS-Gelelektrophorese nur mit minimalen Mengen Albumin (5 %) kontaminiert und wurde ohne weitere Reinigung verwendet.

2.7.3. Antikörper AG46-48

AG46-48 lässt sich durch Affinitätsreinigung nur in ungenügenden Mengen gewinnen. Fünf Milliliter des oben beschriebenen Gelmaterials binden nur einen Teil des Antikörpers aus 500 µl Aszites. Dies ist wahrscheinlich eine Folge der geringen Kapazität des Gelmaterials. Die Sepharose wurde jedoch bewusst nicht mit grösseren Mengen Cytochrom c gekoppelt, um ladungsbedingte (19 positive und 10 negative Ladungen pro Molekül Cytochrom c bei pH 7) unspezifische Adsorptionsphänomene möglichst zu verhindern.

Ionentauscherchromatografie ist ebenfalls ungeeignet, weil in der niedrigen Ionenstärke des Auftragspuffers (10 mM Kaliumphosphat pH 8) das Protein ausfällt.

Aus der Beobachtung des Löslichkeitsverhaltens leitete sich schliesslich das Reinigungsverfahren ab. Dabei wurde der Aszites nach Zentrifugation 1:3 mit PBS verdünnt und gegen 18 % Na₂SO₄ in Wasser bei Zimmertemperatur 14 Stunden dialysiert. Der Niederschlag wurde abzentrifugiert mit 25000 × g während 15 Minuten, worauf er in destilliertem Wasser aufgenommen wurde. Dann wurde das Präzipitat während 24 Stunden gegen ABS pH 4.0 dialysiert, unlösliches Material abzentrifugiert und der Ueberstand gegen Wasser dialysiert, wobei das Wasser dreimal ausgewechselt wurde. Nach Abzentrifugieren des Niederschlags wurde der Ueberstand mit 10 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 8.0 versetzt und der Ansatz gegen diesen Puffer

dialysiert. Das dabei ausfallende Protein ist aufgrund von SDS-PAGE zu über 90 % reiner IgM-Antikörper.

2.7.4. Antikörper DB68-5

Bezüglich der Reinigung durch Affinitäts- oder Ionentauscherchromatografie gelten hier die gleichen Anmerkungen wie für AG46-48. Es wurden für diesen Antikörper keine weiteren Versuche einer Reinigung vorgenommen. Eine Vorfraktionierung gelingt auch in diesem Fall durch eine Ausfällung mit 18 % Na_2SO_4 bei Raumtemperatur.

2.8. Diverse weitere Verfahren

2.8.1. Isoelektrische Fokussierung

Wir verwendeten ein 5 % Polyacrylamidgel der Schichtdicke 2.5 mm mit einem Harnstoffgehalt von 6 M. Der Ampholytzusatz erfolgte entsprechend der Werkvorschrift (LKB). Als Trägerfolie wurde Gelbond PAG verwendet. Die Gele wurden für die Trennung mit fließendem Wasser auf 10 °C gekühlt. Vor dem Probenauftrag wurden sie mit 8 mA 20 Minuten vorfokussiert. Die Leistungsaufnahme wurde auf 9 Watt begrenzt.

M. Keck versuchte ferner, AG46-48 Protein in einem Agarosegel zu fokussieren. Das Protein wurde mit Natriumsulfat gefällt und der Niederschlag nach Auflösung extensiv gegen Wasser dialysiert. Die wasserunlösliche Fraktion wurde weiterverarbeitet. Das Protein wurde in 0.2 % SDS und 1 % CHAPS gelöst auf ein Agarosegel aufgetragen, welches 1 % CHAPS und 2 % Triton X 100 enthält. Der Antikörper fokussierte unter diesen Bedingungen mit einem isoelektrischen Punkt von 6.2.

2.8.2. F_{ab} -Fragmente

Wir versuchten, aus gereinigten IgM F_{ab} -Fragmente herzustellen. Dazu befolgten wir eine für IgG entwickelte Vorschrift (80). Eine 4.6 mg/ml Anti-

körperlösung in PBS wurde mit 1 M Merkaptoethanol bis zu einer Endkonzentration von 10 mM im Ansatz versetzt. Danach wurde 1:30 (w/w) Papain zugegeben, der Ansatz mit N_2 überschichtet, und die Mischung während 18 Stunden bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1 M Tris-HCl pH 8.6 bis zu einer Endkonzentration von 20 mM und Natriumjodoacetat 0.5 M bis zu 11 mM im Ansatz gestoppt. Die Fragmente wurden anschliessend über Sephadex G-200 in PBS vom unverdauten IgM getrennt.

Die verwendete Papainlösung wurde unter den gleichen Bedingungen an bovinem Gammaglobulin vorgetestet. Die Verdauung ergab eine Ausbeute von knapp 30 %.

Ferner wurde versucht, aus einer ähnlichen Präparation von AG46-54 F_{ab2} -Fragmente herzustellen. Die F_{ab2} -Fragmente können anschliessend unter reduzierenden Bedingungen gespalten und zur Stabilisierung alkyliert werden (81). Dazu wurde eine Lösung mit 0.6 mg/ml Antikörperprotein in ABS mit 1:8 (w/w) Pepsin versetzt und 1 Stunde bei 37 °C inkubiert. Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte mit dem Bio-Rad Assay (Coomassieblau-Methode) nach Werksvorschrift. Der Ansatz wurde schliesslich über eine Sephadex G-50 Säule 0.9×20 cm, in PBS mit 0.1 % BSA getrennt.

Die F_{ab2} -Fragmente wurden danach durch Dialyse gegen 18 % Na_2SO_4 ausgefällt. Das Präzipitat wurde in Wasser aufgenommen und gegen PBS dialysiert. Die F_{ab2} -Fragmente wurden bei -20 °C eingefroren aufbewahrt.

Die Spaltung der F_{ab2} -Fragmente in F_{ab} -Fragmente durch reduzierende Bedingungen wurde nicht durchgeführt.

2.8.3. Immunelektrophorese

Nach der elektrophoretischen Trennung der Antiseren wurden als Antigenlösung Cytochrom c Oligomere zugegeben, die mit Glutaraldehyd verbunden worden waren. Dieses Vorgehen erwies sich als ungeeignet für den Nachweis von Anti-Cytochrom c-Antikörpern, weil die Oligomere nicht in

den Agar diffundierten, beziehungsweise dort ohne Antikörperzugabe Fällungslinien erzeugten, welche mit Präzipitationslinien verwechselt werden könnten.

Für die Aufschlüsselung der Immunantwort nach Immunglobulin-Klassen wählten wir deshalb ein anderes Vorgehen. Dabei wurde der oben beschriebene 'solid-phase'-RIA modifiziert. Statt ein unspezifisches Anti-Ratten-Immunglobulin-Serum als Quelle für den zweiten Antikörper zu verwenden, verwendeten wir Immunglobulinklassen-spezifische Kaninchenantisera in einer Verdünnung von 1:200. Im letzten Inkubationsschritt wurde wieder radioaktiv markiertes Protein A verwendet. Jedes Serum wurde in unterschiedlichen Verdünnungen sowohl mit Anti-IgG als auch mit Anti-IgM ausgemessen und die Titer wurden verglichen.

Zuvor hatten wir festgestellt, dass ein Enzymimmunoassay mit Chlornaphthol und H_2O_2 als Substrat eine allgemeine unspezifische Farbreaktion ergab, die auf das Cytochrom c zurückgeführt werden konnte.

3. Resultate

3.1. Der Radioimmunoassay

Der Radioimmunoassay kann schon mit 0.5 μg Cytochrom c erfolgreich durchgeführt werden. Die einmal vorbereitete Testplatte kann, mit 1 % BSA-PBS überschichtet, bei 4°C zwei Wochen aufbewahrt werden. Die unspezifische Bindung nimmt dabei zu und die maximale Menge aufgenommener Radioaktivität schwindet. Die Korrelation der Messwerte zwischen frischen und alten Platten bleibt aber ausgezeichnet ($r=0.91$) und bei Verwendung von positiven und negativen Kontrollen tritt auch kein Informationsverlust auf.

Der Farr-Test wurde zuerst in der modifizierten Form übernommen, die von der Lausanner Arbeitsgruppe entwickelt worden war. Die Ausfällung

von Apo-Cytochrom c ist mit 32 % PEG 6000 in PBS weniger bedeutend als mit Ammoniumsulfat. Mit nativem Cytochrom c hingegen ergibt sich keine Verbesserung des Testes, indem das jodierte Protein auch in halbgesättigter $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Lösung nicht ausfällt. Das Herstellen der Lösungen und das Pipettieren sind mit PEG viel umständlicher, so dass der klassische Farr-Test bevorzugt wurde.

Eine weitere Modifikation des Verfahrens, nämlich die Fällung des Antigen-Antikörperkomplexes mit 18 % Natriumsulfat wurde aus ähnlichen Erwägungen ebenfalls verlassen. Die unspezifische Fällung war nicht geringer als mit dem Ammoniumsalz; die schlechtere Löslichkeit des Natriumsalzes bedingte dabei den Einsatz grösserer Volumina an Fällungsmittel, was den Test erheblich umständlicher gestaltete.

3.2. Immunantwort und Fusionen

Balb/c Mäuse erzeugten mit beiden Immunisierungsmethoden keine Titer über 1:40. Dabei erhielten die Mäuse bis zu 8 Antigeninjektionen. Gelegentlich wurden nach i.p. Applikation eines Antigens hohe Antikörpertiter in der Aszitesflüssigkeit gefunden (50). Trotzdem hatten auch Versuchstiere, die nach einer versehentlichen i.p. Verabreichung von Cytochrom c einen Aszites entwickelten, keine bessere Immunantwort. Eine Fusion zwischen Mausmilzzellen und F0-Myelomzellen ergab unter etwa 100 Hybriden keine mit Anti-Cytochrom c-Aktivität.

Lou-Ratten hatten nach durchschnittlich 2 Booster-Injektionen mit nativem Cytochrom c Titer bis über 1:320; das geometrische Mittel der Titer lag dabei bei 1:100. Die Titer nach Immunisierung mit dem Konjugat betrugen im Mittel 1:50. Das KLH-Cytochrom c-Konjugat war unlöslich, so dass die Bestimmung der Konzentration für die Festlegung der Antigenmenge erst nach Hydrolyse möglich war. Wir haben nicht versucht, die Kopplungseffizienz zu bestimmen; der Reaktionsüberstand des Kopplungsexperimentes wies keine messbare Extinktion bei $\lambda = 410 \text{ nm}$ mehr auf. Es ist unwahrscheinlich, aber nicht ausgeschlossen, dass ein Teil des Cytochroms c nur an KLH adsorbiert war.

Die Tiere mit den höchsten Titern wurden dann für die Fusionsexperimente eingesetzt. Zwei Fusionen wurden mit nativ immunisierten Ratten und dem Y3-Myelom versucht. Dabei entstanden nur etwa 20 lebensfähige Hybride in 2400 'wells', wovon keine irgendwelche Anti-Cytochrom c-Aktivität aufwiesen. Es wurde kein Versuch unternommen, festzustellen, worauf das Versagen dieser Fusionen zurückzuführen war.

Vier Fusionen zwischen Rattenmilzzellen und dem F0-Myelom wurden durchgeführt. Drei Fusionen wurden mit Cytochrom c-immunen Milzzellen und eine weitere wurde mit den Milzzellen einer Ratte vorgenommen, die mit Konjugat immunisiert worden war. Dabei entstanden insgesamt etwa 3000 Hybride.

3.3. Die Hybride und deren Antikörper

Von den entstandenen 3000 Hybriden wurden die besten weiter charakterisiert und die Zellen eingefroren. Sehr viele Hybride wiesen eine erhebliche unspezifische Bindung auf, die zum Teil sogar ein mehrfaches der spezifischen Bindung betrug. Durch Fusionieren und Kultivieren der Zellen in einem Kulturmedium mit 10 µg Cytochrom c pro Milliliter wurde diesbezüglich keine Verbesserung erzielt. Die weiter untersuchten Hybride sind in Tabelle 1, zusammen mit ihren Bindungseigenschaften aufgeführt.

Die Hybride mit der besten Anti-Cytochrom c-Aktivität wurden kloniert durch 'limiting dilution' mit einer Dichte von 0.3 Zellen pro Loch der Kulturplatte. Die Eigenschaften der Klone sind in Tabelle 2 aufgeführt. Die Bindungseigenschaften von AG46-48 und AG46-54 gegen Cytochrom c von einigen Spezies ist in Tabelle 3 wiedergegeben.

Eine weitere Charakterisierung der Antikörper durch isoelektrische Fokussierung wurde für die Mehrzahl der IgM-Antikörper (vgl.u.) aus verschiedenen Gründen nicht versucht, unter anderem, weil die Proteine bei niedriger Ionenstärke in Aggregaten ausfallen und nicht in ein 5 % Polyacrylamid-Fokussiergel eindringen. In SDS-Gelen wandern AG46-48 und -54,

sowie DB68-5 und -6 je paarweise identisch. Die Hybride AG46 und DB68 produzieren IgM, wie wir durch Inkubation der Zellen mit ^{35}S -Methionin und Autoradiografie der SDS-PAGE der Kulturüberstände gezeigt haben.

Es ist bekannt (51), dass Hybride, vor allem Maus $\times$ Ratte, häufig genetisch instabil sind und infolge von Chromosomenverlusten die Fähigkeit, Antikörper zu produzieren, einbüßen können. Durch wiederholtes screening der Klone und rechtzeitiges Subklonieren kann ein drohender Verlust oft abgewendet werden. Wir haben gefunden, dass vor allem die Klone AG46-54 und DB68-6 bei in vivo-Passagen eine ausgeprägte Instabilität aufweisen.

Der Antikörper 2.61 ist schon gut charakterisiert und in der Literatur beschrieben (52). Trotzdem gelang eine weitere, sehr beachtenswerte Beobachtung mit dem 2.61-Hybrid. Nachdem eine bestrahlte DBA/2-Maus nach Inokulation einer kleinen Zellmenge erst nach 4 Wochen einen Aszites entwickelt hatte, wurden die darin enthaltenen Zellen in unbestrahlte DBA/2-Mäuse injiziert, in der Annahme, dass sie sich vielleicht 'adaptiert' haben könnten. Zu unserer Ueberraschung erwies sich das 2.61-Hybrid wirklich als histokompatibel mit DBA/2. In jedem Fall entstanden nach Injektion dieser Zellen intraabdominale Tumormassen mit geringer Invasion in umliegendes Gewebe, und bei grösseren Inokula (10^7 Zellen) entwickelte sich auch Aszites mit normalem Gehalt an 2.61-Antikörper. Einige Aliquots dieser Zellen wurden unter der Bezeichnung HKL1 für spätere Untersuchungen eingefroren.

Die Affinität der Antikörper für Cytochrom c wurde einerseits mit dem Farrtest und andererseits mit einem umgekehrten 'solid-phase'-RIA gemessen. Sie beträgt für beide AG46-Hybride etwa $K_d = 4.2 \times 10^{-6}$ M. Für DB68-Hybride wurde keine Affinität bestimmt. Die Affinität von Antikörper 2.61 wurde im Rahmen der Messabweichung als identisch mit dem publizierten Wert von 5×10^{-8} M gefunden.

3.4. F_{ab} -Fragmente

Unter den beschriebenen Bedingungen gelang es nicht, mit Papain grössere Mengen an F_{ab} -Fragmenten aus IgM abzuspalten. Ein Teil des unverdauten Antikörperproteins fiel bei längerdauernder Inkubation aus und konnte nicht weiter gespalten werden. Die F_{ab} -Fragmente hingegen, die im Zeitpunkt der Ausfällung schon gebildet waren, wurden rasch weiter verdaut. Nach Inkubationsende lagen neben unverdaulichem Antikörper kleinmolekulare ($MW \leq 10000$ g/mol) Peptide vor. Um Antikörperprotein zu sparen, verzichteten wir auf weitere Verdauungsversuche mit Papain.

Das Vorgehen mit Pepsin erschien uns erfolgversprechender (81). Unter den erwähnten Bedingungen (vgl. Methodikteil) wurden aus bovinem IgG mit etwa 50 % Ausbeute F_{ab2} -Fragmente erzeugt. Aus AG46-48 wurden so mit etwa 30 % Ausbeute F_{ab2} gewonnen.

4. Diskussion

Wir vermuten, dass bei Cytochrom c eine geringe Antigenmenge eine schlechte Immunantwort ergibt. Dafür sprechen die folgenden Tatsachen. Erstens reagierten die Tiere nicht mit einem messbaren Titeranstieg auf die kleinere Cytochrom c-Menge (20 µg), die vor gewissen Fusionen verabreicht wurde, in der Hoffnung, möglichst nur hochaffine Antikörper zu stimulieren. Zweitens ergab die Immunisierung mit KLH-Konjugat eine gesamthaft schlechtere Immunantwort, was insofern zu unserer obgenannten Vermutung passt, als nur etwa 39 % des Konjugates Cytochrom c darstellt, gesamthaft für die Injektionen aber immer nur die gleiche Proteinmenge eingesetzt wurde wie bei nativem Cytochrom c. Schliesslich wird Cytochrom c leicht aus dem Alumen-Präzipitat herausgelöst. Schon dreimaliges Resuspendieren des Niederschlags in PBS zur Neutralisation führt zu messbarem (E_{410}) Verlust von Cytochrom c. Es wurde sich daher empfehlen, Cytochrom c wie üblich (53, 54) mit Glutaraldehyd zu polymerisieren und auf möglichst 'native' Bedingungen für die Immunisierung zu verzichten.

Für das geplante Modifikationsexperiment könnte ein affinitätsgereinigtes Hyperimmunserum vielleicht Verwendung finden. Aus methodischen Gründen wurde aber doch der Verwendung von monoklonalen Antikörpern der Vorzug gegeben. Dabei ist einem möglichen Fallstrick aber Beachtung zu schenken; wie schon in der Einleitung erwähnt, kommt der Selektion des zu verwendenden Antikörpers grosse Bedeutung zu. Ein repräsentatives Gesamtbild ergibt sich erst durch Untersuchung zahlreicher Antikörper. Da Cytochrom c nur ein Modellantigen ist und in vivo kaum je in Körperflüssigkeiten zirkulieren dürfte, ist es schwierig, eine biologische Wirkung des Antikörpers zu definieren. Bei Anwendung der Methode auf ein Virus-Oberflächenprotein in einem späteren Zeitpunkt, wäre es bedeutsam, zuerst zu zeigen, dass der Antikörper seine protektive Wirkung am Versuchstier auch wirklich entfaltet.

Wir hatten das Glück, dass uns St. Demotz ein vorzügliches Hybrid zur Verfügung stellte, mit dem die Modifikation schliesslich vorgenommen wurde. Die eigenen Antikörper waren zwar im 'solid-phase'-Radioimmunoassay von akzeptabler Spezifität, hätten aber für das Experiment einige bedeutende Nachteile gehabt. Erstens waren sie durch einfache Affinitätsreinigung nicht in genügender Menge isolierbar und zweitens hatten sie eine deutlich geringere Affinität. Ferner stellte das bedeutende Molekulargewicht ein Hindernis für viele proteinchemische Verfahren dar; für die differentielle Modifikation wären bestenfalls F_{ab} -Fragmente in Frage gekommen.

Bei längerdauernder Immunisierung ist bei der Immunantwort eine sogenannte Reifung zu beobachten: die Antikörper weisen eine höhere Affinität auf und gehören zumeist der IgG-Klasse an (55). Es erstaunt deshalb, dass wir trotz mehrfacher Immunisierung der Versuchstiere nur IgM produzierende Klone isoliert haben. Dafür gibt es verschiedene mögliche Erklärungen. Der RIA für die Auswahl der Hybride könnte IgM empfindlicher detektiert haben als IgG und deshalb wären bevorzugt IgM-Hybride kloniert worden. Diese Möglichkeit ist ernsthaft in Betracht zu ziehen, auch wenn als Kontrolle immer der IgG-Antikörper 2.61 mitgeführt wurde.

Ferner wäre möglich, dass die zur Fusion verwendeten Tiere vorwiegend IgM produziert haben, was automatisch zu einem Ueberwiegen von IgM-Klonen in den Fusionen geführt hätte. Dieser Möglichkeit sind wir nachgegangen, indem wir die Immunantwort nach Immunglobulin-Klassen aufgeschlüsselt haben (vgl. Immunelektrophorese-Methodik). Wenn wir die IgG und IgM-Titer in den Antiseren vergleichen, ergibt sich ein uneinheitliches Bild. Ob IgG oder IgM überwog, war individuell stark verschieden und weitgehend unabhängig von der Dauer der Immunisierung. Auch nach mehr als einem Jahr gab es noch einzelne Versuchstiere, welche eine reine IgM-Antwort aufwiesen. In einem Fall konnten wir zeigen, dass nach Stimulation mit 100 µg Antigen eine starke IgG-Antwort vorlag, und dass nach einer weiteren Injektion von nur 20 µg Antigen IgM im Serum deutlich überwog. Die obgenannten Befunde sind jeder für sich allein ungenügend, um zu erklären, weshalb nur IgM-produzierende Klone isoliert wurden, weisen aber in die gleiche Richtung und könnten deshalb zusammen dafür verantwortlich gewesen sein.

Eine offensichtliche Erklärung für das Auftreten von vielen unspezifischen Antikörpern in den Fusionen fehlt uns. Dieses Phänomen ist aber auch bei anderen Antigenen schon beobachtet worden (56). Es konnte in unserem Fall aus zwei Gründen besonders ausgeprägt gewesen sein. Erstens weist der zweistufige Radioimmunoassay auch unspezifische Bindungen besonders empfindlich nach. Zweitens ist eine starke unspezifische Reaktion bei IgM deshalb zu erwarten, weil die Avidität des Antikörpers auch bei unspezifischen Bindungen infolge der zehn Bindungsstellen recht erheblich ist.

Abgesehen von wahrscheinlich unbedeutenden Unterschieden in der Bindung an verschiedene Cytochrome c im 'solid phase' Radioimmunoassay sind die Klone AG46-48 und AG46-54 identisch, wie auch ihrerseits die Klone DB68-5 und DB68-6. Dies ist sogar zu erwarten, indem sie ursprünglich in nur je einem Loch der Zellfusions-Platte gewachsen waren. Die Identität steht jedoch nicht eindeutig fest, weil trotz hoher Dichte an gewachsenen Hybriden (durchschnittlich 1.3 pro 'well') vor der Klonierung keine Anstalten getroffen wurden um festzustellen, ob in den betreffenden Löchern wirklich nur ein Hybrid gewachsen war.

In allen übrigen untersuchten Eigenschaften - SDS-PAGE und Löslichkeit bei tiefer Ionenstärke in Puffern verschiedener pH-Werte - verhielten sich die Produkte der genannten Klone gleich. Ferner weisen AG46-48 und AG46-54 im Rahmen der Messgenauigkeit die gleiche Affinität für Cytochrom c auf. Ausgehend von der Annahme der paarweisen Identität der Hybride wurde dann auf die Kultur von AG46-54 und DB68-6 verzichtet, weil sie, wie oben erwähnt, genetisch instabiler waren als das entsprechende Gegenstück.

Die Histokompatibilität von Hybrid 2.61 wurde nicht weiter untersucht. Insbesondere ist ungeklärt, ob der Stamm-Klon eventuell auch schon histokompatibel war, oder ob diese Eigenschaft erst durch die verlängerte Kultur und mehrere in vivo-Passagen entstanden ist. Ebenso ist ungeklärt, ob, und wenn ja wie weit, die erwarteten H2-Antigene ($H2^S$ beziehungsweise $H2^d$) noch exprimiert werden.

Lokalisieren der Bindungsstelle von Antikörper 2.61 auf Cytochrom c

1. Theorie

Für die Untersuchung der Bindungsstellen in Proteinkomplexen stehen viele verschiedene Untersuchungsmethoden zur Verfügung. Sie sind alle im Prinzip auch auf die Antigen-Antikörperreaktion anwendbar, seit mit den monoklonalen Antikörpern genau definierte Proteine zur Verfügung stehen. Die wichtigsten werden nachstehend, mit besonderer Berücksichtigung bereits angewandeter Verfahren, kurz gewürdigt.

Die Röntgenstrukturanalyse erlaubt es, sofern die Struktur beider Bindungspartner feststeht, über Lokalisation und Art der Interaktion Hypothesen aufzustellen (57, 58). Direkte Rückschlüsse lassen sich aber nur gewinnen, wenn der kristalline Komplex der Bindungspartner der Strukturanalyse unterzogen wird. Es ist bei weitem die aufwendigste aller Methoden, gibt aber als einzige auch eine direkte Antwort auf die Frage, wieweit die Komplexbildung die Struktur der Bindungspartner beeinflusst. Gegenwärtig beschäftigt sich eine Arbeitsgruppe in Frankreich (27) mit der Aufklärung der Struktur eines Komplexes zwischen Lysozym und monoklonalen Anti-Lysozym-Antikörpern.

Die Modifikation eines oder beider Bindungspartner lässt ebenfalls gewisse Schlüsse über die Bindungsstelle zu. Die Modifikation kann auf verschiedene Arten erfolgen. Die 'konventionelle' chemische Modifikation am intakten Protein hat zumeist den Nachteil mangelhafter oder fehlender Spezifität. Der Austausch einzelner Aminosäuren durch gezielte Peptidsynthese stellt eine weitere Möglichkeit dar. Schliesslich kann die Modifikation am Gen, welches das Protein codiert, erfolgen und das modifizierte Protein exprimiert werden. Die genannten Verfahren haben aber einen gemeinsamen

Nachteil: die gewonnene Information ist indirekter Natur. Jede Protein-Modifikation kann auch an weit entfernt gelegenen Teilen der Polypeptidkette zu konformationellen Änderungen führen (34). Eine Beeinflussung der Bindung braucht also nicht zu beweisen, dass die Modifikation auch wirklich an der Bindungsstelle stattgefunden hat.

Eine besondere Untersuchungsmethode ist ferner in all den Fällen möglich, wo die untersuchte Interaktion sich auf ein Bindungsphänomen beschränkt (Rezeptoren, Antikörper): die Bindung von Fragmenten des Bindungspartners. Ausgedehnte Studien liegen zu der Frage vor, wie weit Peptide eines Proteinantigens mit den Antikörpern gegen das native Protein kreuzreagieren (2, 3). Auch hier ist die gewonnene Information indirekter Natur, indem ausser Zweifel steht, dass Peptide in Lösung nur zu einem kleinen Teil die gleiche dreidimensionale Konformation aufweisen wie im nativen Protein.

Die Methode des 'affinity labelling' besteht darin, den einen Bindungspartner chemisch so vorzubereiten, dass man nach der Bildung des Komplexes eine chemische Reaktion auslösen kann. Diese Reaktion wird am Komplexpartner nun ausschliesslich Reste im Bereich der Bindungsstelle betreffen können. Durch anschliessende Isolierung und Identifikation der Reste lässt sich die Bindungsstelle eingrenzen.

Zwei Methoden, die über die Bindungsstelle direktere Aussagen zulassen, sind bisher am Antigen-Antikörperkomplex noch nicht angewendet worden. Es handelt sich dabei um das 'crosslinking' und um die differentielle chemische Modifikation. Für das 'crosslinking' wird der Komplex unter Bedingungen, bei denen in Lösung das Antigen überwiegend an seinen Antikörper gebunden vorliegt, kovalent verbunden (Ref. in 59). Durch Isolieren der Reste, die an der Verbindung beteiligt sind, lässt sich zeigen, welche Aminosäuren an der Kontaktstelle liegen. Das Verfahren ist schwierig und recht aufwendig; es verlangt ausserdem die Kenntnis der Aminosäuresequenz beider Reaktionspartner.

Die differentielle chemische Modifikation basiert auf einer Erweiterung der Idee des 'competitive labelling', welche von Kaplan et al. (60) vorgebracht wurde. Das Verfahren erlaubt es, die Reaktivität einer Aminosäureseitenkette am nativen Protein in Lösung zu bestimmen. H. R. Bosshard (12) schlug eine Erweiterung dieser Methode vor, die es gestattet, gleichzeitig für eine grosse Anzahl von Resten die Reaktivität zu bestimmen. Das Experiment wird in der Weise durchgeführt, dass bei sonst identischen Bedingungen in parallelen Ansätzen einmal nur freies Protein und einmal der Komplex der Bindungspartner modifiziert wird.

Durch die Bindung an den Komplexpartner wird eine ganze Anzahl von Resten in ihrer Reaktivität beeinflusst. Insbesondere werden die Aminosäureseitenketten, die an der Kontaktfläche liegen, vom Zutritt des Reagens abgeschirmt. An einer ganzen Reihe von Proteinkomplexen wurde dann gezeigt, dass sich so die Bindungsstelle eingrenzen lässt (61-63). Auch andere Arbeitsgruppen haben mittlerweile dieses Verfahren erfolgreich angewendet (64-67).

An ganz anderen Komplexen von Biopolymeren sind analoge Methoden angewendet worden, die jeweils ebenfalls genaue strukturelle Information lieferten (68-71).

Es ist naheliegend, diese Methode auch für andere Proteininteraktionen anzuwenden. Es bieten sich zum Beispiel Peptidhormon-Rezeptor, Zelloberflächenprotein-Virus oder eben Antigen-Antikörperinteraktionen dafür an.

Einige technische Details sind dabei von Bedeutung - man vergleiche dazu auch die Angaben in der ursprünglichen Publikation der Methode. Erstens soll die Konzentration der Komplexpartner möglichst weit über der Dissoziationskonstante liegen, denn der Komplex sollte für die Dauer der Modifikation stabil sein. Deshalb muss auch die Modifikation unter möglichst physiologischen Bedingungen bezüglich pH und Salzkonzentration stattfinden. Das Reagens muss unter diesen Bedingungen aktiv sein, möglichst schnell reagieren - wiederum wegen der Stabilität des Komplexes während der Modifikation - und sich radioaktiv markieren lassen.

Dann muss darauf geachtet werden, dass der Einbau an Reagens möglichst weit unter 1 mol/mol Protein bleibt. Dies aus zwei Gründen: erstens ist für die Messung der Reaktivität der Seitenketten die Anfangsgeschwindigkeit der Reaktion massgebend, und zweitens beeinflusst möglicherweise die Reaktion eines Aminosaurerestes die Reaktion anderer Gruppen. Dieser Störfaktor wird durch die niedrige Einbaurrate ausgeschaltet; deshalb muss auch radioaktives Reagens verwendet werden, denn im Nanomolmasstab kann der Einbau an Reagens mit chemisch-analytischen Methoden nur schwer gemessen werden.

Ein technisches Problem entsteht dadurch, dass auch die Aminosäurereste des Komplexpartners um das Reagens konkurrieren. Dem kann auf verschiedene Weise begegnet werden. Erstens kann man versuchen, durch erhöhte Zugabe von Reagens zum Proteinkomplex (sogenannter B-Ansatz: 'bound') die Einbaumenge in das interessierende Protein an die im F-Ansatz (Protein frei in Lösung) erhaltene anzugleichen. Dies ist jedoch nur möglich, wenn die Aminosäurezusammensetzung der beiden Proteine genau bekannt ist. Ferner wurde auch schon versucht, dem F-Ansatz den Bindungspartner zuzugeben und die Bindung durch Zugabe von Salz aufzuheben. Bei Antikörpern ist die Bindung jedoch nur sehr wenig von der Ionenstärke abhängig; zudem hat A. Stocker (72) gezeigt, dass die Ionenstärke des Ansatzes einen nicht zu vernachlässigenden Einfluss auf die Reaktivität der Aminosäureseitenketten ausübt.

Wir haben uns im Experiment für eine dritte Methode entschieden. Wir gaben dem Ansatz eine kleine Menge Phenylalanin zu. Dessen α -Aminogruppe konkurriert mit den ϵ -Aminogruppen des Lysins um das Reagens. Durch Vergleich der Einbaurate in F- und B-Ansatz kann der Rückschluss auf die in den Ansätzen herrschenden Reaktionsbedingungen erfolgen.

Theoretisch konnten alle Modifikationsreaktionen zur Anwendung gelangen, die den oben gestellten Forderungen genügen. In unserer Arbeitsgruppe wurden erst zwei Verfahren praktisch entwickelt und erprobt. Wir entschieden uns im vorliegenden Experiment für die Modifikation der ϵ Aminogruppen des Lysins mit Essigsäureanhydrid wegen der ver-

hältnismässigen Einfachheit des Verfahrens und weil bei 19 Lysinresten pro Cytochrom c-Molekül die Wahrscheinlichkeit bestand, dass wenigstens ein oder zwei Reste durch den Antikörper abgeschirmt würden.

Aus technischen Gründen wurde anschliessend an das Modifikationsexperiment das Cytochrom c mit einem vollständig ^{14}C -modifizierten Cytochrom c versetzt und unter denaturierenden Bedingungen vollständig acetyliert. Dies verhinderte, dass das differentiell modifizierte, radioaktive Cytochrom c, welches immer nur einen Bruchteil des Materials darstellte, bei der Peptidtrennung verloren ging. Radioaktives und 'kaltes' Cytochrom c waren nach der vollständigen Modifikation identisch bis auf die Kohlenstoff- und Wasserstoffisotope.

Die Zugabe des ^{14}C -markierten Proteins dient der Mengen- und Konzentrationsbestimmung.

2. Material und Methoden

2.1. Differentielle Modifikation

Die differentielle Modifikation der ϵ -Aminogruppen der Lysinreste erfolgte mit $[^3\text{H}]$ Essigsäureanhydrid. Die 'free' (F) und 'bound' (B) Ansätze wurden immer strikte parallel gehandhabt. Der Modifikationspuffer enthielt 80 mM Kaliumphosphat pH 7.8 und 70 mM NaCl. Eine Gesamtübersicht über das Modifikationsexperiment ist in Abbildung 1 dargestellt. Die Modifikation erfolgte in gerührten Contes-vials.

Der F-Ansatz enthielt 36.5 nmol Cytochrom c, 100 nmol Phenylalanin, 1 μCi $[^{14}\text{C}]$ Phenylalanin mit der spezifischen Aktivität 509 Ci/mol und 100 nmol $[^3\text{H}]$ Essigsäureanhydrid der spezifischen Aktivität 6940 Ci/mol. Der B-Ansatz enthielt ausserdem 20 nmol 2.61-Antikörper und wegen der grösseren Proteinmenge insgesamt 500 nmol $[^3\text{H}]$ Essigsäureanhydrid. $[^3\text{H}]$ Essigsäureanhydrid wurde, in Acetonitril gelöst (7 μl /100 nmol), direkt

mit einer Spritze in die Lösung gegeben. Die Mischungen wurden bei Raumtemperatur während 30 Minuten gerührt.

Anschliessend wurde den Ansätzen noch 200 nmol Cytochrom c in 10 mM Natriumphosphatpuffer pH 7 und 5 μ mol N-Acetylphenylalanin in Glycin-NaOH pH 9.3 zugegeben. Danach wurde das modifizierte Cytochrom c über eine 0.9×16 cm Säule von Bio-Gel P-6 in 1 M Glycin-NaOH pH 9.3 von [^3H]Essigsäure und anderen niedermolekularen Produkten (u.a. N-Acetylphenylalanin) getrennt. Der B-Ansatz wurde mit weiteren 400 nmol Cytochrom c als Träger versetzt und über eine Bio-Gel P-100 Säule (0.9×65 cm) in Kaliumphosphatpuffer pH 2.8 (300 mM mit 300 mM NaCl) vom Antikörper getrennt.

Dann wurden zum F-Ansatz 800 nmol und zum B-Ansatz weitere 400 nmol Cytochrom c zugegeben. Die Gesamtmenge differentiell acetylierten Cytochroms c war 990 nmol für F und 1030 nmol für B. Pro μ mol Cytochrom c wurden dann 384 μ l der Lösung von ^{14}C -acetyliertem Cytochrom c zugegeben (vgl. dort). Das $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ -Verhältnis für die F-probe betrug anschliessend 9.69; dasjenige der B-Probe 27.2.

2.2. Der interne Standard

Die α -Aminogruppe von Phenylalanin konkurriert in den Modifikationsansätzen mit den Lysinseitenketten um das radioaktive Reagens. Es entsteht eine Spur N- ^3H Acetylphenylalanin. Das nach Reaktionsende zugefügte unmarkierte N-Acetylphenylalanin erlaubt die Isolierung des Produktes. Die Bestimmung der spezifischen ^3H -Aktivität erlaubt es, die ^3H -Einbauraten in den Ansätzen abzuschätzen und entsprechende Korrekturen vorzunehmen.

Da die Bestimmung eines $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ -Verhältnisses technisch einfacher ist als die Messung einer Aminosäurenkonzentration im Nanomol-Massstab, wurde den Modifikationsansätzen ^{14}C markiertes Phenylalanin zugegeben. Das $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ Verhältnis spiegelt direkt die Einbaurate des ^3H -Reagens in die Aminogruppen des Ansatzes wieder.

N-Acetylphenylalanin wurde von Phenylalanin auf HPLC getrennt. Verwendet wurde eine Aquapore RP-300 Säule, 4.6×220 mm. Die Elution erfolgte mit einem Wasser-TFA/Acetonitril-TFA Gradienten (Abb. 2). Die Trennung wurde mit unmarkierten Substanzen optimiert; so wurde auch die Elutionsposition des genuinen N-Acetylphenylalanins ermittelt. Wir kennen die Natur der vor dem N-Acetylphenylalanin eluierenden Substanzen nicht.

2.3. Herstellung von ^{14}C -acetyliertem Cytochrom c

Das vollständig acetylierte Cytochrom c wurde von H.R.B. folgendermassen dargestellt. Cytochrom c (200 nmol), desamidofrei (Ausgangsmaterial war Sigma Typ III), in 500 μl Wasser, wurden mit 500 mg festem Guanidin-HCl versetzt und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurden 50 μl Lutidin zugegeben. Zwei Ampullen $[^{14}\text{C}]$ Essigsäureanhydrid, entsprechend 1 mCi in 22 μl 5 % w/w Toluol, wurden mit 40 μl Acetonitril aufgenommen und in die Proteinlösung gegeben. Die Ampullen wurden mit insgesamt weiteren 20 μl Acetonitril ausgespült und das restliche Reagens ebenfalls zu der Mischung gegeben. Nach 30 Minuten bei Zimmertemperatur wurden 400 nmol Cytochrom c als Träger zugegeben und der Ansatz (Gesamtvolumen ca. 2 ml) auf eine 1.5×28 cm Sephadex G-10 Säule geladen.

Die Elution erfolgte mit 10 mM Natriumphosphatpuffer pH 6.5. Die Proteinfraktion - 4.9 ml - enthielt 440 nmol Cytochrom c (aus E_{410}) einer spezifischen Aktivität von 3.92×10^{14} dpm/mol.

2.4. Vollständige Acetylierung von Cytochrom c und Hydroxylamin-Behandlung

Durch Ultrafiltration über eine UF-C5 Membran wurden die Proben in 0.1 M HEPES pH 8 umgepuffert, weil wir festgestellt hatten, dass Phosphat die vollständige Acetylierung stört. Die Ansätze wurden mit einem gleichen Volumen gesättigter Natriumacetatlösung bei Raumtemperatur versetzt und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Auf Eis wurde anschliessend mit einem

40-fachen molaren Ueberschuss (über die Aminogruppen) an Essigsäure-anhydrid in 5 Portionen für je 12 Minuten vollständig acetyliert.

Durch Ultrafiltration wurde das Gemisch schliesslich wieder in HEPES pH 8 umgepuffert. Die Behandlung mit Hydroxylamin erfolgte in Veronalpuffer pH 7.5 (20 mM Veronal; 2M NaCl) mit 0.1 M Hydroxylamin in Veronalpuffer bei Raumtemperatur während 1 Stunde. Es fiel dabei Cytochrom c aus, das sich aber bei höherem pH wieder löste. Die Proben wurden über eine 0.9×15 cm Bio-Gel P-6 Säule in 100 mM HEPES pH 8 umgepuffert und anschliessend bei -20°C bis zur weiteren Verwendung eingefroren.

2.5. Herstellung der Peptide und ihre Trennung

Modifiziertes Cytochrom c (150 nmol) wurde mit 1:10 (w w) Chymotrypsin in 1.44 ml 100 mM HEPES pH 8 bei 37°C verdaut. Das Chymotrypsin wurde in 3 Aliquots jeweils alle 2 Stunden zugegeben. Nach Ende der Inkubation wurde die Verdauung durch Zugabe von 5 ml destilliertem Wasser und Einfrieren der Probe abgebrochen. Die Peptide wurden gefriergetrocknet.

Für die Trennung auf HPLC wurden die Peptide in 1 ml 0.067 % TFA in quartzdestilliertem Wasser aufgenommen. Das Trennungsmuster wurde mit 15 nmol Peptid analysiert. Präparative Läufe wurden mit 75 nmol Peptid vorgenommen. Die Trennung erfolgte auf einer Aquapore RP-300 -Säule, 4.6×220 mm, Partikelgrösse 10 μm , mit einem einzigen, optimierten Gradientensystem. Rechromatografien wurden mit den gleichen Elutionsmitteln bei einem weniger steilen Gradienten durchgeführt. Puffer A enthielt 0.067 % TFA in quartzdestilliertem Wasser; Puffer B war 0.067 % TFA in 60 % Acetonitril/Wasser (v v). Ein repräsentatives Elutionsprofil ist in Abbildung 3 dargestellt. Die Identität der Peptide ist auf der Abbildung vermerkt.

Für die Isolierung der Lysinreste 5, 7 und 8 wurde das Peptid 1-10 mit V8-Protease verdaut. Dazu wurden 75 nmol des Peptides in 2 % $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ in Wasser gelöst. Dann wurde 1:1 (w-w) V8-Protease in 2 % $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ zugegeben und die Mischung bei 37°C während 6 Stunden inkubiert. Die

Probe wurde anschliessend direkt über HPLC isoliert. Das Elutionsprofil ist in Abbildung 4 dargestellt.

Der Verdau der Cytochrom c Proben mit Thermolysin, die Isolierung und Identifikation der Peptide und ihr Abbau wurden von L. Braun vorgenommen. Die Verdauung wurde mit 1:22 (w/w) Thermolysin in 100 mM HEPES pH 8 in 2 Aliquots für je 3 Stunden angesetzt. Für die Isolierung und Identifikation der Peptide wurden die gleichen Methoden verwendet. Ein repräsentatives Elutionsprofil ist in Abbildung 5 wiedergegeben.

Abbildung 6 zeigt das Gradientenprofil für eine repräsentative Rechromatografie.

2.6. Aminosäurenanalyse der Peptide

Aus der spezifischen ^{14}C -Aktivität der Lysinreste wurde eine ungefähre Peptidmenge bestimmt (F: 630 ^{14}C -dpm/nmol B: 484 ^{14}C -dpm/nmol). Etwa 5 nmol Peptid wurden pro Analyse eingesetzt.

Die Menge wurde in einem Hydrolyseröhrchen am Rotationsverdampfer vollständig eingedampft und mit 6 N HCl versetzt. Die Salzsäure wurde durch Einfrieren und Auftauen am Hochvakuum entgast und die Probe verschlossen (Restdruck etwa 0.02 Torr). Die Hydrolyse fand bei 110 °C während 22 Stunden statt. Anschliessend wurde das Hydrolysat am Rotationsverdampfer bei 40 °C von der HCl befreit und bis zur Analyse bei 4 °C aufbewahrt. Die Analyse erfolgte auf einem Durrum D-500 Amino Acid Analyzer.

2.7. Edmann Abbau der isolierten Peptide

Wir verwendeten die modifizierte Methode nach Chang (73). Das Verfahren wurde mit wenigen Änderungen übernommen. Es wurde jeweils die ganze Ausbeute eines gegebenen Peptides eingesetzt. Diese Betrug zwischen 2

nmol und 40 nmol, je nach Güte der Spaltstelle der Verdauungsenzyme. DABITC der Qualitätsbezeichnung purum (Fluka) wurde ohne weitere Reinigung verwendet. Aliquots von 100 µl Ethyl- und Butylacetat wurden vor Gebrauch über eine 2.5×15 cm Säule von Aluminiumoxid gereinigt. Das Auswaschen überschüssigen Reagens' nach dem PITC- Kopplungsschritt wurde bis zu viermal wiederholt, wobei das 1:2 Ethylacetat-Heptan-Gemisch bei Restpeptidlängen unter 3 Aminosäureresten durch ein 1:3 Gemisch ersetzt wurde. Dadurch wurde verhindert, dass grössere Mengen Restpeptid mit der organischen Phase verworfen wurden. Das Konvertieren zu den DABTH-Aminosäuren wurde mit 2 µl TFA in 200 µl 1 N HCl während 10 Minuten bei 80 °C vorgenommen.

Die durchschnittliche Ausbeute pro Abbauschritt betrug 96.3 %.

2.8. Diverse weitere Verfahren

2.8.1. SDS-PAGE

Die Vorschrift von Laemmli (74) wurde befolgt mit Ausnahme nachstehender Aenderungen. Die Elektrophorese wurde für das Obergel mit 8 mA und für das Trenngel mit 25 mA durchgeführt. Die Färbung erfolgte ohne vorherige Fixation direkt in einer Lösung mit 0.2 % Coomassie-Blau in 9 % Essigsäure, 45 % Methanol / Wasser. Die Entfärbelösung bestand aus 7 % Essigsäure und 30 % Methanol in Wasser.

2.8.2. Oligomerisieren von Cytochrom c mit Glutaraldehyd

Ungereinigtes Pferdeherz-Cytochrom c (Typ III, Sigma) wurde nach folgendem Verfahren oligomerisiert (75). Eine 750 µM Lösung in 100 mM Natriumphosphatpuffer pH 7 wurde mit dem gleichen Volumen 16 mM Glutaraldehydlösung in Phosphatpuffer versetzt und während 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von festem L-Lysin-monohydrochlorid zu einer Endkonzentration von 100 mM im Ansatz gestoppt. Nach weiteren 60 Minuten bei Raumtemperatur wurde der Ansatz über eine 2.4×100 cm Sephadex G-200 Säule in PBS getrennt.

Die im Ausschlussvolumen laufende Fraktion wurde durch Ultrafiltration über eine YM 2-Membran aufkonzentriert. Die so erzeugten Cytochrom c-Oligomere sind löslich, dringen aber nicht in ein 10 % Polyacrylamidgel ein.

2.8.3. CNBr-Fragmente von Cytochrom c

Für die Herstellung der Fragmente wurden 100 mg ungereinigtes Cytochrom c in 2 ml 70 % Ameisensäure gelöst und mit 500 mg CNBr in 5 ml 70 % HCOOH versetzt. Unter Lichtabschluss wurde die Mischung bei Raumtemperatur 44 Stunden inkubiert. Der Ansatz wurde anschliessend 10-fach mit Wasser verdünnt und im Rotationsverdampfer bei 40 °C getrocknet.

Der Rückstand wurde in 2 × 2 ml 7 % HCOOH aufgenommen und die Fragmente wurden auf einer Sephadex G-50 Säule getrennt. Dimensionen 1.5 × 140 cm, Elutionsgeschwindigkeit 8.7 ml/h, Elutionsmittel 7 % Ameisensäure. Die Fragmente 66-80 und 81-104 erschienen rein, einzig Fragment 1-65 war nach den Ergebnissen der Aminosäurenanalyse mit Fragment 1-80 kontaminiert. Eine Trennung von Peptid 1-65 und Peptid 1-80 durch Rechromatografie ist mit diesem System nicht möglich und die Kontamination ist für den gewünschten Verwendungszweck des Peptides unerheblich. Die Konzentration der Peptide wurde mittels Aminosäurenanalyse bestimmt.

2.8.4. Apo-Cytochrom c

Zwei Vorschriften wurden verglichen (76, 77). Das verwendete Cytochrom c war Sigma Typ III und wurde, nachdem es für eine Kinetikmessung an Cytochromoxidase verwendet worden war, durch Ionentauscherchromatografie über Carboxymethylzellulose gereinigt.

In der Vorschrift nach Ambler (76) wird das Haem nach der HgCl₂-Behandlung des Cytochroms c mit Diethylether extrahiert. Um die Extraktion möglichst vollständig zu gestalten, wurde sie fünfmal wiederholt, bis von Auge keine Färbung der Etherphase mehr sichtbar war. Die Perameisensäure zur abschliessenden Oxidation der Cysteinreste wurde für den Gebrauch frisch erzeugt durch Inkubation von 9.5 ml 98 % Ameisensäure mit

Perhydrol (30 % H_2O_2) unter Verschluss während 2 Stunden bei Raumtemperatur. Das Verfahren ist sehr einfach und schnell, aber die Ausbeute beträgt nur etwa 27 %.

In der Chessa-Vorschrift (77) wird die Thioetherbrücke zwischen Protein und Haem durch Inkubation mit Ag_2SO_4 in saurem Milieu während 48 Stunden gelöst. Das Haem wird mit angesäuertem Aceton extrahiert und dabei das Protein und ein Silbersalz gefällt. In Abwandlung der Originalvorschrift wurde der Niederschlag vor der Zugabe von Merkaptoethanol zuerst in 8 M Harnstoff in 10 % Essigsäure über Nacht gelöst. Für eine Einwaage von 32.5 mg Cytochrom c wurden 50 μl Merkaptoethanol verwendet. Dabei wurde ein Silbersalz gefällt; der Ueberstand mit dem Protein wurde anschliessend gegen 10 % Essigsäure bei 4°C dialysiert und zuletzt lyophilisiert.

Schliesslich wurde das Apo-Cytochrom c nach der Vorschrift von Crestfield (78) carboxymethyliert. Das Lyophilisat wurde dazu in 8 M Harnstoff in 360 mM Tris-HCl pH 8.6 mit 0.2 % EDTA aufgenommen und unter Luftabschluss mit 100 μl Merkaptoethanol während 4 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Die Carboxymethylierung wird dann durch Zugabe von 270 mg Jodessigsäure in 1 ml 1 M NaOH gestartet und für 15 Minuten bei Raumtemperatur unter Lichtabschluss durchgeführt. Ebenfalls unter Lichtabschluss erfolgt dann die Trennung des Proteins von kleinmolekularen Produkten und Harnstoff über eine Sephadex G-75 Säule 3 $\times$ 22 cm in 50 % Essigsäure bei 4°C. Die Säulenpackung ist nur für eine Trennung geeignet, weil sie durch den Harnstoff zerstört wird.

Die Gesamtausbeute bei diesem Vorgehen betrug 45 %.

2.8.5. Ninhydrinreaktion

Unter den nachgenannten Bedingungen reagieren pro mol Cytochrom c 16.5 mol NH_2 -Gruppen mit Ninhydrin, gemessen gegen Phenylalanin und Glycin als Standards. Damit lässt sich die Vollständigkeit der Acetylierung der Lysinreste überprüfen.

Gleiche Volumina einer Lösung von 40 g Ninhydrin pro Liter Cellosolve und eines Citratpuffers (200 mM Citrat pH 5.0) mit 1.6 g $\text{SnCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ pro Liter wurden gemischt. Die Mischung wurde anschliessend während 30 Minuten mit N_2 durchgeblasen und unter Stickstoff bei 4 °C in der Dunkelheit aufbewahrt. Die Probe (200 µl) in Citratpuffer wurde mit 1 ml Ninhydrin-Reagens versetzt und im Wasserbad während 20 Minuten gekocht. Sofort anschliessend wurde zu allen Ansätzen 5 ml 50 % (v/v) Isopropanol/Wasser pipettiert. Nach 15 Minuten wurde im Photometer bei 570 nm abgelesen. Die Aminosäuren weisen unterschiedliche Farbkonstanten auf (79). Die Nachweisgrenze für Leucin und Phenylalanin lag bei etwa 2 nmol Aminogruppen im Ansatz.

2.9. Messung der Radioaktivität

Die Messung der Radioaktivität erfolgte in einem Kontron Betamatic 2 Flüssigszintillationszähler. Die Proben wurden in Borosilikat-Zählröhrchen (Kontron) mit je 7 ml Kontrogel gezählt. Die Zählhausbeute in Abhängigkeit vom Quenchgrad wurde für ^3H und ^{14}C gesondert mit internen Standards ermittelt. Als interne Standards dienten: [^3H]Cholesterin und Glycerin- [^{14}C]Tripalmitat. Als Quenchsubstanz wurde Aceton zugegeben bis maximal 15 Volumenprozent.

Die Zählfenster wurden für ^3H eingestellt auf 1.1 bis 6.1 keV, ^{14}C wurde bei 18 bis 156 keV gemessen. Entsprechend der Werkseinstellung wurden dabei von ungequenchten ^3H -Proben maximal 2 % der Zerfälle im ^{14}C -Kanal beobachtet. Der 'spillover' von ^{14}C -Zerfällen in den ^3H -Kanal betrug maximal 15 % und war typischerweise um 10 %. Die Zählzeit wurde entsprechend der Probenaktivität angepasst für maximal 5 % Zählfehler ($[\text{beobachtete Zerfälle}]^{-0.5} \leq 0.05$). Die Rückrechnung auf stattgehabte Zerfälle (dpm) erfolgte mit der Standardsoftware.

Die Bestimmung des Quenchgrades erfolgte mit der Externen-Standard-Methode (ESR) und der Kanal-Verhältnis-Methode (SCR). Die Übereinstimmung der Zählraten für ^{14}C mit den zwei Methoden war zufriedenstellend mit

$\log(\text{cpm}_{\text{ESR}}) = .98 \times \log(\text{cpm}_{\text{SCR}}) + .40$; $r = 0.97$). Die ESR wurde ermittelt aus dem Mittelwert von 3×30 Sekunden Probenbestrahlung durch eine ^{133}Ba -Quelle von 9 μCi Aktivität in werkseits festgelegten Kanälen. Die SCR an doppeltmarkierten Proben wurde aus dem Verhältnis der Zählraten zweier Kanäle bestimmt, die oberhalb vom Ende des ^3H -Spektrums liegen. Kanal A 28 bis 34 keV; Kanal B 32 bis 156 keV; ^3H -*'spillover'* ist dabei $\sim 10^{-5}$

Der Background betrug maximal 15 % des Signals, typischerweise aber unter 0.5 %.

3. Resultate

3.1. Affinitätsbestimmungen

Die Affinität der Antikörper für Cytochrom c wurde einerseits mit dem Farrtest und andererseits mit einem umgekehrten *'solid-phase'*-RIA gemessen. Der Farr-Test erlaubt die direkte Bestimmung von gebundener (Radioaktivität im Niederschlag) und freier Antigenmenge (Ueberstand). Ein Diagramm der entsprechenden Daten ist in Abbildung 7 wiedergegeben. Für eine Darstellung als Scatchard-Plot sind die Daten wenig geeignet, weil die meisten Datenpunkte im Bereich 0 % und 100 % Sättigung des Antikörpers liegen, wo die Streuung der Messwerte stark ist.

Die Berechnung des K_d erfolgte durch *'least square fitting'* aller Datenpunkte an eine für verschiedene Bindungsparameter berechnete Sättigungskurve (Software für HP 150 von B. Michel). Die Affinität von Antikörper 2.61 wurde im Rahmen der Messabweichung als identisch mit dem publizierten Wert von 5×10^{-8} M gefunden.

Für den umgekehrten RIA wurden etwa 500 ng Antikörper (als Aszites oder affinitätsgereinigt) durch Inkubation in PBS über Nacht an einer Mikrotiterplatte fixiert. Unspezifische Bindung wurde wie üblich abgesättigt. Anschliessend wurde radioaktiv markiertes Cytochrom c in verschiedenen

Verdünnungen und versetzt mit variablen Mengen unmarkierten Proteins auf den Platten inkubiert. Ein konstanter Anteil des Ueberstandes (80 %) wurde entnommen und ausgezählt; multipliziert mit dem entsprechenden Faktor (1.25) ergibt dies den 'free'-Anteil. Der restliche Ueberstand wurde verworfen und die Platte viermal mit eiskaltem PBS gespült. Die nach dem Waschen ausgezählte Platte ergibt den 'bound'-Anteil.

Das Scatchard-Diagramm 'bound'/'free' vs. 'bound' erlaubte die Abschätzung der Affinität. Sie beträgt für beide AG46-Hybride etwa $K_d = 4.2 \times 10^{-6} \text{ M}$ (vgl. Abb. 8). Für DB68-Hybride wurde keine Affinität bestimmt.

3.2. Kreuzreaktionen von 2.61 mit Cytochrom c verschiedener Spezies

Für die Prüfung von Kreuzreaktionen mit Cytochrom c von verschiedenen Spezies, CNBr-Fragmenten von Cytochrom c und desamidierten Formen ist der solid phase RIA ungeeignet. Der Antikörper kann sich gleichzeitig mit beiden Antigenbindungsstellen festsetzen, so dass die apparente Avidität die Affinität der einzelnen Bindungsstelle um Größenordnungen überschreitet.

Der Test wurde immer unter Bedingungen durchgeführt, die eine direkte Konkurrenz der zugegebenen Antigene um den Antikörper erlaubten. Insbesondere wurde der Antikörper immer erst nach Einstellung des Konzentrationsgleichgewichtes zwischen den konkurrierenden Antigenen zupipettiert.

Der Antikörper wurde immer im Ueberschuss über das ^{125}J -Cytochrom c zugegeben. Typischerweise betrug das Verhältnis Antigen zu Antikörperbindungsstellen in Ansätzen ohne Zugabe von 'kaltem' Cytochrom c etwa 1:20. Die Antikörperpräparationen enthielten unterschiedliche Anteile an nativem Antikörper. Ferner wurde immer eine positive Verdrängungskontrolle mit Pferde-Cytochrom c mitgeführt. Repräsentative Verdrängungskurven sind in Abbildung 9 wiedergegeben. Tabelle 4 enthält weitere Daten über die Kreuzreaktivität von Antikörper 2.61.

Für die Interpretation der Daten verweisen wir auf Abbildung 10. Dort werden die Sequenzen der Cytochrome c, die für Bindungsstudien verwendet wurden, verglichen. Glu 92 ist der einzige Rest, der bei allen nicht-kompetierenden Cytochrom c ausgetauscht ist. An allen anderen Positionen hat wenigstens eines der nichtbindenden Cytochrom c die gleiche Sequenz wie das Pferde-Cytochrom c. Man sieht, dass ein Austausch an Glu 92 zum Verlust der Bindung an den Antikörper führt. Der Austausch von Lys 60 gegen einen Glycinrest beeinflusst die Bindung nicht messbar.

Der Austausch Glu gegen Asn in Position 61 beim Thunfisch-Cytochrom c hat möglicherweise auch einen Einfluss auf die Bindungsstärke. Er bewirkt eine Ladungsänderung innerhalb der möglichen Ausdehnung des Epitopes. Die beschränkte Messgenauigkeit bei den Kompetitionsassays erlaubt es aber nicht festzustellen, ob feine Bindungsunterschiede für Thunfisch-Cytochrom c bestehen.

3.3. Differentielle Modifikation

Während der differentiellen Modifikation wurden im F-Ansatz pro mol Cytochrom c 0.28 mol $[^3\text{H}]$ Essigsäure eingebaut. Dies entspricht 15 nmol ^3H -Acetyl-Aminogruppen pro mol Aminogruppen. Im B-Ansatz wurde 0.81 mol $[^3\text{H}]$ Essigsäure pro mol Cytochrom c eingebaut. Dies ist darauf zurückzuführen, dass der Antikörper im Modifikationsansatz B schwächer als erwartet um das Reagens konkurriert hat.

Zu beiden Ansätzen wurden 34.4 nmol ^{14}C -acetyliertes Cytochrom c pro μmol differentiell modifizierten Cytochroms c zugegeben. Dies ergab ein $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ -Gesamtverhältnis r_f von 9.69 für den F- und $r_b = 27.2$ für den B Ansatz. Dies zeigt wiederum, dass ϵ -Aminogruppen im B-Ansatz stärker reagiert haben. Der interne Standard sollte dieses Verhältnis der Reaktivität, $R = r_f \cdot r_b$, widerspiegeln. Für N-Acetylphenylalanin wurde ein R-Wert von 1.60 ± 0.06 gemessen.

3.4. Totale Acetylierung

Die vollständige Acetylierung wurde unter verschiedenen Bedingungen versucht. Der molekulare Ueberschuss an Essigsäureanhydrid über die Aminogruppen wurde dabei immer 40-fach gewählt. Die Zugabe erfolgte in 3 bis 5 Portionen. In einigen Ansätzen war Lutidin zugegen, weil wir annahmen, dass es die Acetylierung des Lysins unter intermediärer Bildung eines Acetylutidinium-Ions (82) katalysieren könnte.

Zwei verschiedene Puffer (HEPES 0.1 M pH 8, Kaliumphosphat 0.3 M pH 7.5) wurden verwendet, und in einigen Ansätzen wurde Cytochrom c durch Zugabe von 1 g Guanidin-HCl für jeden ml Lösung denaturiert. Zugabe von Lutidin und Guanidin-HCl zu den Ansätzen führte zu Abspaltung eines haemhaltigen Fragmentes. Dies wurde zuvor schon beobachtet (H.R.B., persönliche Mitteilung), aber die Natur dieses Spaltproduktes wurde nie näher untersucht.

Versuche zur Denaturierung durch Erhöhen der Temperatur, was zu einer sofortigen Ausfällung des Cytochroms c bei Zugabe von Lutidin oder Essigsäureanhydrid führte und die Modifikation in Phosphatpuffer, wo die Acetylierung nur 40 - 60 % erreichte (gemessen mit Ninhydrin), wurden nicht weiter verfolgt.

Die beste Acetylierung (immer über 90 %, meist 95-98 %) ergab sich nach folgender Vorschrift (83): die Proteinlösung wurde mit einem gleichen Volumen bei Raumtemperatur gesättigter Natriumacetatlösung versetzt und über Nacht bei 4°C inkubiert. Anschliessend wurde auf Eis das Essigsäureanhydrid in Portionen während einer Stunde zugegeben. Der pH zu Beginn der Reaktion war um 9, am Ende um 6-7. Dann wurde das Protein durch Gelfiltration oder Ultrafiltration von Acetat und Essigsäure getrennt.

3.5. Radioaktivitätsmessung

Die Genauigkeit der ^{14}C -Zählung wurde mit einer Messung dokumentiert, bei welcher der Quenchgrad der Probe nach einem anderen Verfahren bestimmt wurde. Die Korrelation war ausgezeichnet (vgl. Methodenteil).

Für die Auszählung der DABTH-Aminosäurederivate wurde ein eigenes Zählprogramm erstellt, dessen Leistungen an Proben bekannter Aktivität ermittelt wurde. Nach rechnerischer Korrektur erschienen maximal 0.6 % der dpm einer ungequenchten ^{14}C -Probe als ^3H -dpm, während maximal 0.01 % der ^3H -dpm als ^{14}C -dpm gezählt wurden. Zählergebnisse an ungequenchten $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ -Verhältnis-Standards lagen mit ± 3 % innerhalb der Pipettiergenauigkeit für die Herstellung der Standards, unabhängig vom aktuellen Verhältnis, welches von 0.85 bis 85.7 variiert wurde.

Verschiedene Quenchgrade und unterschiedliche Füllhöhen der Zählgläser hatten einen bescheidenen Einfluss (0.2 - 5 %) auf die Zählgenauigkeit. Die Abnahme der absoluten Aktivität der Probe unter 100 dpm führte hingegen zu starken Einbussen an Zählgenauigkeit (relative Fehler 10 - 30 %), obwohl der statistische Zählfehler immer unter 5 % (vgl. Methoden) gehalten wurde. Dazu ist zu bemerken, dass die Bestimmung der dpm mit einigem rechnerischem Aufwand erfolgt, und dass dabei die Fehler der einzelnen Messwerte mehrfach in den Fehler der Gesamtbestimmung einfließen. Ferner wird der Einfluss der Ungenauigkeit der Background-Aktivität bei tiefen Zählraten immer bestimmender. In der Tabelle 5 sind die erwarteten Fehler für Zählbedingungen aufgeführt, wie sie bei unseren Experimenten vorlagen. Insbesondere entspricht der Quenchgrad mittleren Werten, wie wir sie beobachtet haben, wenn 20 % der Ausbeute an DABTH-Aminosäure in 5 bis 20 μl 40 % Acetonitril gelöst zu 7 ml Kontrogl Zählflüssigkeit gegeben wurde.

3.6. R-Werte

Die Verhältnisswerte zwischen r_{f1} und r_{f2} aus zwei verschiedenen Modifikationen mit freiem Cytochrom c (F-Ansatz von A. Burnens und Ansatz 'C'

von A. Stocker; Modifikation in 20 mM Triethanolamin-HCl pH 8 und 200 mM NaCl) sind in Abbildung 11 dargestellt.

Sie geben ein Mass für die Variabilität der zu erwartenden R-Werte im Hauptversuch. Diese beträgt 35 %. Davon entfallen auf die Radioaktivitätsmessung mindestens 30 bis etwa 60 %. Beachtenswert ist, dass weder Lys 60 noch Lys 99 besonders extreme Werte aufweisen; das Verhältnis für Lys 99 ist sogar besonders tief. Dies unterstützt die Behauptung, dass die hohen R-Werte für diese Reste im Hauptversuch wirklich bedeutsam sind.

Die R-Werte aus dem Hauptversuch sind in Abbildung 12 dargestellt. Die einzelnen r_f - und r_b -Werte sind in Tabelle 6 zusammengestellt. Die Werte für Lys 22, 27, 55, 60, 72, 73, 86, 87, 88, 99 und Lys 100 wurden von L. Braun im Doppel bestimmt. Die Korrelation zwischen den Messungen war gut mit $R_{\text{Burnens}} = 0.805 \times R_{\text{Braun}} + 0.087$; $r = 0.886$. Die 95 % Vertrauensgrenzen sind eingetragen (± 1.96 S.D.). Lys 60 und Lys 99 waren im Komplex signifikant weniger reaktiv, während die Reaktivität von Lys 27 signifikant erhöht war.

Wir haben während des Edmann-Abbaues festgestellt, dass die Threoninreste auch etwas radioaktiv markiert waren. Die Einbaurate betrug etwa 1 bis 10 % derjenigen von Lys-Resten. Sie genügte in günstigen Fällen für die Messung eines R-Wertes. Diese sind ebenfalls in Abbildung 12 aufgeführt.

Durch die Hydroxylaminolyse wurden [^3H]-Acetylgruppen an Tyrosinresten vor dem proteolytischen Verdau entfernt. Wir konnten zeigen, dass der Tyrosinrest 48 nach der Hydroxylaminolyse nur noch etwa 5 % der Tritiumaktivität eines Lysinrestes enthält.

4. Diskussion

Wir konnten zeigen, dass im Cytochrom c-Antikörper-Komplex das Verhältnis der chemischen Reaktivität der Lysinseitenketten untereinander anders ist

als im freien Cytochrom c. Die generell höhere Einbaurate im komplexierten Cytochrom c kann eine Folge der anderen Reaktionsbedingungen im B-Ansatz oder aber auf die Antikörperbindung zurückzuführen sein. Zwar hatte auch der interne Standard im B-Ansatz eine höhere Einbaurate, aber im Verhältnis bei weitem nicht im gleichen Ausmass wie Cyt c. Diese Diskrepanz könnte auf mehrere Ursachen zurückzuführen sein. Es könnte sich erstens um einen prinzipiellen Zählfehler handeln: das ^3H ^{14}C -Verhältnis des N-Acetylphenylalanins betrug 300 beziehungsweise 600 und das Zählprogramm wurde nicht für so extreme Werte ausgetestet. Dass das gemessene Verhältnis deswegen um den Faktor 2 verfälscht sein sollte, ist aber unwahrscheinlich. Es spricht alles dafür, dass bei den verwendeten Anhydridmengen die Acetylierung des internen Standards diejenige des Cytochroms c nur unvollkommen widerspiegelt. Die $[\text{^3H}]$ -Acetat-Einbaurate in Phenylalanin betrug nämlich im F-Ansatz 0.47 mol/mol und im B-Ansatz 0.76 mol/mol. Im F-Ansatz hat also fast die Hälfte des zugesetzten $[\text{^3H}]$ -Essigsäureanhydrids mit dem internen Standard reagiert; die Anhydridmenge dürfte für den Einbau limitierend gewesen sein. Im Gegensatz dazu ist der interne Standard im B-Ansatz fast vollständig modifiziert; hier war die Phenylalaninmenge limitierend. Dass der interne Standard die Reaktionsbedingungen nicht adäquat wiedergeben kann, erstaunt unter diesen Voraussetzungen nicht.

Die R-Werte wurden für die 15 mittleren Werte auf 1.0 normiert. Auch ohne Normierung ist erkennbar, dass die Reaktivitäten von Lys 60 und Lys 99 im Komplex signifikant vermindert sind, während Lys 27 signifikant stärker reagiert als im freien Cytochrom c. Dafür gibt es verschiedene mögliche Erklärungen. Eine sterische Behinderung des Reagenszutritts durch die Antikörperbindung führt sicher zu einer starken apparenten Reaktivitätsminderung. Die Ausbildung von Wasserstoffbrücken und ionische Interaktionen an der Kontaktfläche konnten diesen Effekt verstärken. Eine mögliche Abschwächung des Abschirmeffektes könnten folgende Phänomene bewirken: Bindung von Reagens an der Kontaktfläche, Konformationsänderung des Cytochroms c durch Antikörperbindung mit verbessertem Reagenszutritt, Polaritätsänderungen mit Erhöhung der Reaktivität und die Tatsache, dass immer ein Teil der Komplexpartner ungebunden vorliegt. Bei Betrachtungen

über die 'Polarität' einer Umgebung scheint nach neueren Erkenntnissen eine gewisse Vorsicht angebracht (84).

Eine nachträgliche Unterscheidung der Mechanismen, die zu dem beobachteten Effekt geführt haben, ist kaum möglich. Sterische Behinderung des Reagenszutrittes durch den Antikörper führt ohne jeden Zweifel zu hohen R-Werten. Die Beobachtung $R > 1$ ist ferner eine hypothetische Folge nachgeannter Mechanismen: Reaktivitätsminderung durch ionische Interaktionen oder Wasserstoffbrückenbildung zwischen Aminosäureseitenketten oder Polaritätsänderungen in der Umgebung von Lysinresten. Die einfachste Erklärung unserer Befunde ist also, dass der Antikörper die Reste Lys 60 und Lys 99 abgeschirmt hat. Lys 27 hingegen wäre möglicherweise durch eine Verformung des Cytochroms c bei der Antikörperbindung etwas reaktiver geworden. Hinweise für die mögliche Deformation von Proteinantigenen durch Antikörperbindung sind schon beschrieben worden (25).

Die R-Werte für Lys 60 und Lys 99 sind weniger hoch, als früher bei abgeschirmten Resten beobachtet wurde (62, 63). Dies und die relativ starke Streuung der R-Werte sind vielleicht deshalb besonders ausgeprägt, weil Cytochrom c im B-Ansatz relativ stark modifiziert worden ist (0.81 mol/mol). Dies ist darauf zurückzuführen, dass der Antikörper schwächer als erwartet um das Reagens konkurriert hat.

Verschiedene Mechanismen, die zu erhöhter Reaktivität führen (vgl. o.) könnten den Abschirmeffekt des Antikörpers maskieren. Es wäre theoretisch sogar denkbar, dass dadurch ein abgeschirmter Rest verpasst würde. Durch Modifikationsbedingungen, bei denen pro mol Cytochrom c unterschiedliche Mengen radioaktiven Reagens' eingebaut werden, könnte diese Hypothese vielleicht getestet werden. Ferner ist zu beachten, dass das Cytochrom c-Molekül einen starken Dipol darstellt. Der negative Pol liegt dabei in der Nähe der postulierten Bindungsstelle; ionische Interaktionen, welche die Reaktivität besonders stark herabsetzen würden, dürften dabei vor allem Carboxylgruppen betreffen. Diese Hypothese liesse sich durch Modifikation von Carboxylgruppen testen; diese müssten dabei ausgeprägt hohe R-Werte aufweisen.

Die Resultate der differentiellen Modifikation passen gut zu den Befunden aus Kreuzreaktivitätsuntersuchungen mit dem Antikörper. Während die erstgenannte, neue Methode lokalisatorische Hinweise gibt, also auf Reste hinweist, die räumlich zur Bindungsstelle gehören, weisen Bindungsexperimente mit Cytochrom c anderer Spezies auf antigen oder immunogen bedeutende Reste hin. So ergänzen sich die Methoden gegenseitig und weisen damit auf ein Epitop hin, welches mindestens Lys 60, Lys 99 und Glu 92 umfasst. Die entsprechenden Reste des Thunfisch Cytochroms c liegen in der Raumstruktur 9.2 Å bis 14.3 Å voneinander entfernt (85, Abb. 13). Beachtenswert ist ferner, dass einige benachbarte Lysinreste, die räumlich in das Epitop passen würden (Lys 5 : 12.3 Å Abstand zu Glu 92 bei Thunfisch-Cytochrom c; Lys 87 : 12.8 Å; Lys 88 : 4.85 Å), dank ihres tiefen R-Wertes als nicht zur Determinante gehörig erkannt werden können.

Zu Glu 92 als immunogenem Rest passt weiter, dass bei der Maus Glu 92 gegen Alanin ausgetauscht ist und daher das Pferdecytochrom c vom Immunsystem als fremd erkannt werden kann (86, 87). Wir arbeiten gegenwärtig an der differentiellen Modifikation der Cytochrom c-Carboxylgruppen, um diese Behauptung zu untermauern.

Wenn wir, was unsere Daten nahelegen, davon ausgehen, dass der Antikörper die räumliche Struktur des Cytochroms c erkennt, so müsste die Störung dieser dreidimensionalen Struktur zu einer Störung der Antikörperbindung führen. Die Tatsache, dass Apo-Cytochrom c, eine stabil denaturierte Form des Cytochroms c, nicht mit dem nativen Protein um die Antikörperbindung konkurriert, stützt diese Annahme. Dies bedeutet nicht notwendigerweise, dass es sich beim beschriebenen Epitop um eine diskontinuierliche antigene Determinante handelt, spricht aber auch nicht dagegen. Ein weiterer Hinweis auf die diskontinuierliche Natur des Epitopes wäre eine Beteiligung von Glu 61 an der Bindungsstelle, was sich wiederum mit der differentiellen Modifikation der Carboxylgruppen zeigen liesse. Eine Bindungsstudie mit einem Cytochrom c-Hybrid mit Thunfischsequenz 1-65 und Pferdesequenz 66-104 konnte auch zeigen, wieweit Glu 61 an der Bindung beteiligt ist. Die fehlende Kreuzreaktion von Antikörper 2.61 mit CNBr-Fragmenten weist ebenfalls darauf hin, dass Raumstruktur und gemeinsame

Beteiligung von Lys 60 und Lys 99 für die Bindung nötig sind. Die schwache Kreuzreaktion mit Fragment 1-65 ist wahrscheinlich auf eine Verunreinigung der Präparation mit nativem Cytochrom c zurückzuführen.

Der Befund, dass Rinder-Cytochrom c mit dem Antikörper 2.61 im Rahmen der Messgenauigkeit vollständig mit Pferde-Cytochrom c kreuzreagiert, mag als Diskrepanz erscheinen, wenn man bedenkt, dass wir ein Epitop postulieren, welches Lys 60 einschliesst und bemerkt, dass ausgerechnet Lys 60 beim Rind gegen Glycin ausgetauscht ist. Es besteht natürlich die Möglichkeit, dass der hohe R-Wert von Lys 60 trotz Doppelbestimmung ein Messfehler ist. Viel wahrscheinlicher erscheint uns aber, dass Lys 60 am Rand des Epitopes liegt und dass seine negative Ladung wenig zur Stabilisierung der Antikörperbindung beiträgt. Sogar bei stärkerer Beteiligung der Lysinseitenkette an der Bindung würde man nur dann erwarten, dass der Austausch zu einer Störung der Bindung führt, wenn die neu eingeführte Seitenkette die Antigen-Antikörperinteraktion behindert. Dies könnte durch eine umgekehrte elektrische Ladung des neuen Restes oder durch eine sperrige Seitenkette geschehen. Glycin, welches keine Seitenkette besitzt, kann zwar nichts zur Bindung beitragen, sie aber auch nicht wesentlich beeinträchtigen.

Einer Interpretation bedarf auch der R-Wert von Lys 13. Lys 13 liegt 14.5 Å von Gln 92 des Thunfisch-Cytochroms c entfernt, würde also knapp in die Dimensionen eines Epitopes passen. Der R-Wert liegt an der Grenze der Signifikanz. Wir nehmen an, dass dies einem Randeffect entsprechen könnte. Um dies zu untermauern, müsste der Wert einer Mehrfachbestimmung, gegebenenfalls aus mehreren Modifikationsexperimenten, unterzogen werden.

Unsere Ergebnisse weisen auf die Bedeutung der nativen Struktur für die Antikörperbindung hin. Wenn wir annehmen, dass Lys 60 und 99 sowie Glu 92 zur Bindungsstelle gehören, handelt es sich um den ersten direkten Nachweis einer diskontinuierlichen antigenen Determinante auf Cytochrom c. Dies passt auch zur Beobachtung, dass die Selektion bei der Erzeugung von monoklonalen Antikörpern oft zur Auswahl von Antikörpern führt, welche

konformationelle Epitope erkennen (88). Dies steht in einem gewissen Gegensatz zu der Beobachtung, dass vorwiegend bewegliche Proteinteile antigen sein sollen (89). Obige Behauptung blieb aber nicht unwidersprochen (90) und ist wahrscheinlich sowieso nur für Antikörper gültig, die mittels Peptiden induziert wurden (37).

Schlussfolgerungen

Wir haben zwei monoklonale IgM-Antikörper gegen Cytochrom c hergestellt. Von einem weiteren Antikörper der Immunglobulinklasse G haben wir grössere Mengen erzeugt, gereinigt und für ein Experiment der differentiellen chemischen Modifikation im Komplex mit Cytochrom c verwendet.

An diesem besonders günstigen Modellantigen konnten wir ein Epitop lokalisieren. Unsere Daten sind mit Ergebnissen aus den konventionellen Kreuzreaktivitätsstudien vereinbar und weisen auf die Beteiligung der Seitenketten von Lysin 60 und Lysin 99 des Pferde-Cytochroms c am Epitop hin.

Für eine genauere Charakterisierung der Antikörperbindungsstellen auf Proteinen mit einem geringeren Anteil an Lysinresten wäre die Möglichkeit einer differentiellen Modifikation anderer Seitenketten wünschbar. Dann erscheint eine Anwendung der Methode für die Erkennung von Epitopen auf natürlich vorkommenden und medizinisch bedeutsamen Proteinantigenen von Viren, Bakterien, Protozoen und Parasiten möglich und erfolgversprechend. Die differentielle Modifikation eines Proteinantigens in Anwesenheit ganzer Antiseren könnte zudem eine Antwort auf die Frage geben, wieviele der potentiell möglichen Epitope während der Immunantwort von einem einzelnen Individuum erkannt werden.

Literatur

1. Amzel L.M., Poljak R.J. Three dimensional structure of immunoglobulins
Ann.Rev.Biochem. (1979) 48:961
2. Wilson I.A., Niman H.L., Houghten R.A., Lerner R.A. et al. The structure of an antigenic determinant in a protein
Cell(1984) 37:767
3. Altschuh D., Moudallal Z.Al., Briand J.P., van Regenmortel M.H.V. Immunochemical studies of tobacco mosaic virus. VI. Attempts to localize viral epitopes with monoclonal antibodies
Mol.Immunol. (1985) 22:329
4. Evans D.M.A., Minor P.D., Schild G.S., Almond J.W. Critical role of an eight amino acid sequence of VP₁ in neutralization of poliovirus type 3
Nature (1983) 304:459
5. Weiss R.A., Tedder R.A. et al. Neutralization of human T-lymphotropic virus type III by sera of AIDS and AIDS-risk patients
Nature (1985) 316:69
6. Mathes L.E., Olsen R.G., Hebebrand L.C., et al. Immunosuppressive properties of a virion polypeptide, a 15,000 Dalton protein, from feline leukemia virus
Cancer.Res. (1979) 39:950
7. Atassi M.Z. Antigenic structure of myoglobin: The complete immunochemical anatomy of a protein and conclusions relating to antigenic structures of proteins
Immunochem. (1975) 12:423

8. Berzofsky J.A. Intrinsic and extrinsic factors in protein antigenic structure

Science (1985) 229:932

9. Lerner R.A. Tapping the immunological repertoire to produce antibodies of predetermined specificity

Nature (1982) 299:592

10. Dyson H.J., Cross K.J., Houghten R.A., Wilson I.A., Wright P.E., Lerner R.A. The immunodominant site of a synthetic immunogen has a conformational preference in water for a type-II reverse turn

Nature (1985) 318:480

11. Bosshard H.R. Alkaline isomerization of ferricytochrome c: lysine is not replacing methionine at the sixth coordination site of the haem iron

J.Mol.Biol.(1981) 153:1125

12. Bosshard H.R. Mapping of contact areas in protein-nucleic acid and protein-protein complexes by differential chemical modification

Meth. Biochem. Anal. (1979) 25:273

13. Atassi M.Z., Van Oss C.J., Absolom D.R. Eds. Molecular Immunology, chapters 2/3

Marcel Dekker Inc., New York & Basel 1984

14. Roberts G.C.K., Jardetzky O. Nuclear magnetic resonance spectroscopy of amino acids, peptides and proteins

Adv.Protein Chem. (1970) 24:447

15. Benjamin D.C., Berzofsky J.A., Wilson A.C. et al. The antigenic structure of proteins: a reappraisal

Ann.Rev.Immunol.(1984) 2:67

16. Kaartinen M., Griffiths G.M., Hamlyn P.H., Milstein C. et al Anti-oxazolone hybridomas and the structure of the oxazolone idiotype

J.Immunol. (1983) 130(2):937

17. Burnet F.M. The clonal selection theory of acquired immunity
Cambridge University Press, London & New York 1959
18. Poljak R.J., Amzel L.M., Avey H.P., Chen B.L., et al. Three-dimensional structure of the F_{ab} fragment of a human immunoglobulin at 2.8 Å resolution
Proc.Natl.Acad.Sci.USA (1973) 70(12):3305
19. Matsushima M., Marquart M., Jones T.A., Colman P.M., et al. Crystal structure of the human F_{ab} fragment Kol and its comparison with the intact Kol molecule
J.Mol.Biol. (1978) 121:441
20. Segal D.M., Padlan E.A., Cohen G.H., Rudikoff S., Potter M., Davies D.R. The three dimensional structure of a phosphorylcholine-binding mouse immunoglobulin F_{ab} and the nature of the antigen binding site
Proc.Natl.Acad.Sci.USA (1974) 71(11):4298
21. Köhler G., Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity
Nature (1975) 256:495
22. Köhler G., Milstein C. Derivation of specific antibody-producing tissue culture and tumor lines by cell fusion
Eur.J.Immunol. (1976) 6:511
23. Chance B., Ravilly A., Rumen N. Reaction kinetics of a crystalline hemoprotein: an effect of crystal structure on reactivity of ferrimyoglobin
J.Mol.Biol. (1966) 17:525
24. Wagner G., Wüthrich K. Sequential resonance assignments in protein 1H nuclear magnetic resonance spectra. Basic pancreatic trypsin inhibitor
J.Mol.Biol. (1982) 155:347

25. Crumpton M.J. Conformational changes in sperm-whale metmyoglobin due to combination with antibodies to apo-myoglobin
Biochem.J. (1966) 100:223

26. Duncan R.J.S. Synergistic activation by monoclonal antibodies of β -galactosidase from defective E. coli
in: Celada F., Schumaker V.N., Sercarz E.E. Eds.
Protein Conformation as an Immunological Signal
Plenum Press; New York/London 1983

27. Amit A.G., Mariuzza R.A., Phillips S.E.V., Poljak R.J. Three dimensional structure of an antigen-antibody complex at 6 Å resolution
Nature (1985) 313:156

28. Atassi M.Z. Precise determination of the entire antigenic structure of lysozyme
Immunochem. (1978) 15:909

29. Hannum C.H., Margoliash E. Assembled topographic antigenic determinants of pigeon cytochrome c
J.Immunol. (1985) 135:3303

30. Darsley M.J., Rees A.R. Three distinct epitopes within the loop region of hen egg white lysozyme defined with monoclonal antibodies
EMBO J. (1985) 4(2):383

31. Reinach F.C., Fischman D.A. Recombinant DNA approach for defining the primary structure of monoclonal antibody epitopes
J. Mol. Biol. (1985) 181:411

32. Atassi M.Z. Antigenic structures of proteins
Eur. J. Biochem.(1984) 145:1

33. Jemmerson R., Paterson Y., et al. Analysis of an evolutionarily conserved antigenic site on mammalian cytochrome c using synthetic peptides
Proc.Natl.Acad.Sci.USA (1985) 82:1508

34. Wishner B.C., Ward K.B., Lattmann E.E., Love W.E. Crystal structure of sickle-cell deoxyhemoglobin at 5 Å resolution
J.Mol.Biol. (1975) 98:179
35. Sutcliffe J.G., Shinnick T.M., Green N., Liu F.-T., Niman H.L., Lerner R.A. Chemical synthesis of a polypeptide predicted from nucleotide sequence allows detection of a new retroviral gene product
Nature (1980) 287:801
36. Westhof E., Altschuh D., v. Regenmortel M.H.V. et al. Correlation between segmental mobility and the location of antigenic determinants in proteins
Nature (1984) 311:123
37. van Regenmortel M.H.V. Which structural features determine protein antigenicity?
Trends Bioch.Sci. (1986) 11:36
38. Dickerson R.E., Takano T., Margoliash E. et al. Ferricytochrome c I. General features of the horse and bonito proteins at 2.8 Å resolution
J.Biol.Chem. (1971) 246(5):1511
39. Margoliash E., Smith E.L., Kreil G., Tuppy H. Amino-acid sequence of horse heart cytochrome c
Nature (1961) 192:1121
40. Osheroff N., Jemmerson R., Margoliash E. et al. Site-specific anti-cytochrome c antibodies. Inhibition of the reactions between cytochrome c and its respiratory chain electron exchange partners
J.Biol.Chem. (1979) 254:12717
41. Carbone F.C., Paterson Y. Monoclonal antibodies to horse cytochrome c expressing four distinct idiotypes distribute among two sites on the native protein
J.Immunol. (1985) 135:2609

42. Brautigan D.L., Ferguson-Miller Sh., Margoliash E. Mitochondrial cytochrome c: Preparation and activity of native and chemically modified cytochromes c
Meth. Enzymol. (1978) 53:128
43. Storck J., Tixier R., Uzan A. Immunological investigations of cytochrome c
Nature (1964) 201:835
44. Erlanger B.F. The preparation of antigenic hapten-carrier conjugates: a survey
Meth.Enzymol. (1980) 70:85
45. Kuo Li-Mei, Davies H.C. Production, isolation and characterization of monoclonal antibodies to cytochromes c of beef heart and *Paracoccus denitrificans*
Mol.Immunol.(1983) 20(8):827
46. Hunter W.M., Greenwood F.C. Preparation of iodine-131 labelled human growth hormone of high specific activity
Nature (1962) 194:495
47. Farr R.S. A quantitative immunochemical measure of the primary interaction between ¹³¹I-BSA and antibody
J.Infect.Dis. (1958) 103:239
48. Fazekas de St. Groth S., Scheidegger D. Production of monoclonal antibodies: strategy and tactics
J.Immunol.Meth. (1980) 35:1
49. Galfre G., Milstein C., Wright B. Rat x rat hybrid myelomas and a monoclonal anti-Fd portion of mouse IgG
Nature (1979) 277:131

50. Tung A.S. Production of large amounts of antibodies, nonspecific immunoglobulins and other serum proteins in ascitic fluids of individual mice and guinea pigs

Meth.Enzymol. (1983) 93:12

51. Galfre G., Milstein C. Preparation of monoclonal antibodies: strategies and procedures

Meth.Enzymol. (1981) 73:3

52. Demotz St., Corradin G.P. et al. Fine specificity of monoclonal antibodies specific for native and denatured horse cytochrome c

Mol. Immunol., submitted

53. Jemmerson R., Margoliash E. Topographic antigenic determinants on cytochrome c. Immunoabsorbent separation of rabbit antibodies directed against horse cytochrome c

J.Biol.Chem. (1979) 254:12706

54. Hackenbrock Ch.R., Chau R.M.-W., Hammon K., Höchli L. Localization of enzymes in mitochondrial membranes with ferritin conjugates of affinity purified antibodies

Meth.Enzymol. (1979) 56:683

55. Roitt I. Essential Immunology, 4th Ed. S. 92f.

Blackwell Scientific Publications Oxford, London, Edinburgh 1983

56. Stähli C., Staehelin Th., Miggiano V. Spleen cell analysis and optimal immunization for high-frequency production of specific hybridomas

Meth.Enzymol. (1983) 92:26

57. Poulos T.L., Kraut J. A hypothetical model of the cytochrome c peroxidase - cytochrome c electron transfer complex

J.Biol.Chem. (1980) 255(21):10322

58. de la Paz P., Sutton B.J., Darsley M.J., Rees A.R. Modelling the combining sites of three anti-lysozyme monoclonal antibodies and of the complex between one of the antibodies and its epitope
EMBO J. (1986) 5(2):415
59. Waldmeyer B., Bosshard H.R. Structure of an electron transfer complex I. Covalent cross-linking of cytochrome c peroxidase and cytochrome c
J. Biol. Chem. (1985) 260(8):5184
60. Kaplan H., Stevenson K.J., Hartley B.S. Competitive labelling, a method for determining the reactivity of individual groups in proteins
Bioch. J. (1971) 124:289
61. Rieder R., Bosshard H.R. Comparison of the binding sites on cytochrome c for cytochrome c oxidase, cytochrome bcl and cytochrome cl. Differential acetylation of lysyl residues in free and complexed cytochrome c
J. Biol. Chem. (1980) 255(10):4732
62. Rieder R., Bosshard H.R. The cytochrome c oxidase binding site on cytochrome c. Differential chemical modification of lysine residues in free and oxidase-bound cytochrome c
J. Biol. Chem. (1978) 253(17):6045
63. Bechtold R., Bosshard H.R. Structure of an electron transfer complex II. chemical modification of carboxyl groups of cytochrome c peroxidase in presence and absence of cytochrome c
J. Biol. Chem. (1985) 260(8):5191
64. Giedroc D.P., Sinha S.K., Brew K., Puett D. Differential trace labelling of calmodulin: investigation of binding sites and conformational states by individual lysine reactivities
J. Biol. Chem. (1985) 260(25):13406
65. Chong P.C.S., Hodges R.S. Proximity of sulfhydryl groups to the sites of interaction between components of the troponin complex from rabbit skeletal muscle

J. Biol. Chem. (1982) 257(5):2549

66. Richardson R.H., Brew K. Lactose synthase. An investigation of the interaction site of α -lactalbumin for galactosyltransferase by differential kinetic labeling

J. Biol. Chem. (1980) 255(8):3377

67. Hitchcock-De Gregori S.E. Study of the structure of troponin-I by measuring the relative reactivities of lysines with acetic anhydride

J. Biol. Chem. (1982) 257(13):7372

68. Stollar B.D., Lafer E., Nordheim A., Pardue M.L., Rich A. Immunological probes for the biological significance of Z-DNA

Prog. Clin. Biol. Res. (1985) 172B:323

69. Dynan W.S., Sazer S., Tijan R., Schimke R.T. Transcription factor Sp1 recognizes a DNA sequence in the mouse dihydrofolate reductase promoter

Nature (1986) 319:246

70. Dynan W.S., Tijan R. The promoter-specific transcription factor Sp1 binds to upstream sequences in the SV40 early promoter

Cell (1983) 35:79

71. Gidoni D., Dynan W.S., Tijan R. Multiple specific contacts between a mammalian transcription factor and its cognate promoters

Nature (1984) 312:409

72. Stocker A. Diplomarbeit am Biochemischen Institut der Universität Zürich unter Leitung von Prof. H.R. Bosshard 1986

73. Chang J.-Y. N-terminal sequence analysis of polypeptide at the picomole level

Biochem. J. (1981) 199:557

74. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4
Nature (1970) 227:680
75. Reichlin M., Nisonoff A., Margoliash E. Immunological activity of cytochrome c. III. Enhancement of antibody detection and immune response initiation by cytochrome c polymers
J. Biol. Chem. 245(5):947
76. Ambler R.P. The amino acid sequence of *Pseudomonas* cytochrome c-551
Biochem. J. (1963) 89:349
77. Chessa G., Filippi B., Borin G., Moroder L., et al. Inhibition of the cytochrome c cytochrome c oxidase system by cytochrome c derivatives and related fragments
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. (1980) 361:1077
78. Crestfield A.M., Moore S., Stein W.H. The preparation and enzymatic hydrolysis of reduced and S-carboxymethylated proteins
J. Biol. Chem. (1963) 238(2):622
79. Moore S., Stein W.H. Photometric ninhydrin method for use in the chromatography of amino acids
J. Biol. Chem. (1948) 176:367
80. Springer T.A. Quantitation of hybridoma immunoglobulins and selection of light-chain loss variants
Meth. Enzymol. (1983) 92:147
81. Jennmerson R., Margoliash E. Preparation of site-specific anti-cytochrome c antibodies and their application
Meth. Enzymol. (1981) 74:244
82. Fersht A.R., Jencks P. The acetylpyridinium ion intermediate in pyridine-catalyzed hydrolysis and acyl transfer reactions of acetic anhydride.

Observation, kinetics, structure-reactivity correlations and effects of concentrated salt solutions

J. Am. Chem. Soc. (1970) 92(18):5432

83. Fraenkel-Conrat H. Methods for investigating the essential groups for enzyme activity

Meth. Enzymol. (1957) 4:247

84. Macgregor R.B., Weber G. Estimation of the polarity of the protein interior by optical spectroscopy

Nature (1986) 319:70

85. Swanson R., Trus B.L., Dickerson R.E. et al. Tuna cytochrome c at 2.0 Å resolution

J. Biol. Chem. (1977) 252(2):759

86. Reichlin M. Amino acid substitution and the antigenicity of globular proteins

Adv. Immunol. (1975) 20:71

87. Hennig B. Change of cytochrome c structure during development of the mouse

Eur. J. Biochem. (1975) 55:167

88. Berzofsky J.A., Buckenmeyer G.K., Hicks G., Gurd F.R.N., et al. Topographic antigenic determinants recognized by monoclonal antibodies to sperm whale myoglobin

J. Biol. Chem. (1982) 257(6):3189

89. Tainer J.A., Getzoff E.D., Alexander H., Lerner R.A. et al. The reactivity of anti-peptide antibodies is a function of the atomic mobility of sites in a protein

Nature (1984) 312:127

90. Moudallal Z.A.I., Briand J.P., van Regenmortel M.H.V. A major part of the polypeptide chain of tobacco mosaic virus protein is antigenic
EMBO J. (1985) 4(5):1231

Bezugsquellennachweis, Abkürzungen, Abbildungen und Tabellen

1. Abkürzungen

ABS	Acetatgepufferte Kochsalzlösung
	NaCl 7.77 g/l
	CH ₃ COONa 1.64 g/l
	pH mit HCl auf 4.0 eingestellt
Bisacrylamid	N,N'-Methylen-bisacrylamid
BSA	bovines Serumalbumin
Cellosolve	Methylcellosolve
CFA	komplettes Freund'sches Adjuvans
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio]-propan sulfonat
DABITC	4-Dimethylamino-azobenzol-4'-isothiocyanat
DABTH	Dimethylamino-azobenzol-thioharnstoff
DEAE	Diethylaminoethyl-
DMEM	Dulbecco's modified minimal essential medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDC	N-Ethyl-N'(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid
EDTA	Ethylen-diamin-tetraacetat
ESR	external standard ratio
FCS	fötales Kälberserum
GKN	NaCl 6.0 g/l
	KCl 0.4 g/l
	Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O 1.77 g/l
	NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O 0.69 g/l
	Glukose 2.0 g/l
	Phenolrot 10.0 mg/l
HAT	Hypoxanthin-Aminopterin-Thymidin-Medium
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethansulfonat
HPLC	high performance liquid chromatography

ICFA	inkomplettes Freund'sches Adjuvans												
IDMEM	Iscove's modified DMEM												
IEF	isoelektrische Fokussierung												
Ig	Immunglobulin												
i.p.	intraperitoneal												
KLH	keyhole limpet hemocyanin Haemocyanin aus <i>Megathura crenulata</i>												
Lou	Louvine												
Lutidin	3,4-Dimethyl-Pyridin												
Merkaptoethanol	2-Merkaptoethanol												
p.a.	zur Analyse												
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlosung, für Zellkulturzwecke enthält PBS: <table><tr><td>KH₂PO₄</td><td>0.2</td><td>g/l</td></tr><tr><td>Na₂HPO₄×2H₂O</td><td>1.15</td><td>g/l</td></tr><tr><td>NaCl</td><td>8.0</td><td>g/l</td></tr><tr><td>KCl</td><td>0.2</td><td>g/l</td></tr></table> für proteinchemische Versuche wurde eine einfachere Lösung mit 20 mM Natriumphosphat pH 7.0 und 150 mM NaCl verwendet	KH ₂ PO ₄	0.2	g/l	Na ₂ HPO ₄ ×2H ₂ O	1.15	g/l	NaCl	8.0	g/l	KCl	0.2	g/l
KH ₂ PO ₄	0.2	g/l											
Na ₂ HPO ₄ ×2H ₂ O	1.15	g/l											
NaCl	8.0	g/l											
KCl	0.2	g/l											
PEG	Polyethylenglykol												
PITC	Phenylisothiocyanat												
Pristan	2,6,10,14-Tetramethyl-Pentadekan												
RIA	Radioimmunoassay												
SCR	sample channels ratio												
SDS	Natriumlaurylsulfat												
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese												
TFA	Trifluoressigsäure												
Tris	Tris-hydroxymethyl-aminomethan												
Veronal	Diethylbarbitursäure												

2. Bezugsquellennachweis

Acetonitril	für HPLC Fluka A.G., CH-9470 Buchs
N-Acetylphenylalanin	Bachem Feinchemikalien A.G., CH-4416 Bubendorf
Acrylamid	2 × cryst. Serva Feinbiochemika, D-6900 Heidelberg
Aether	ad narcosin Siegfried A.G., CH-4800 Zofingen
Aluminiumoxyd	90 aktiv, neutral Aktivitätsstufe I E. Merck, D-6100 Darmstadt
Aminopterin	cell culture tested Sigma Chemical Company, St. Louis, Missouri U.S.A.
Ampholine	pH 3 - 10 LKB Produkter, Bromma, Schweden
Aquapore RP-300	Partikel 10µm Brownlee Labs, Santa Clara, California U.S.A.
Bio-Gel P-6	200-400 mesh Bio-Rad Laboratories, Richmond, California U.S.A.
Bisacrylamid	2 × cryst. Serva Feinbiochemika, D-6900 Heidelberg
bovines IgG	cryst. Serva Feinbiochemika, D-6900 Heidelberg
BSA	Fraktion V Fluka A.G., CH-9470 Buchs
Butylacetat	Sequanal grade Pierce Eurochemie B.V., Holland
Cellosolve	Prod. # 999314 Calbiochem, San Diego, California U.S.A.
CFA	Difco Laboratories, Detroit, Michigan U.S.A.
Chymotrypsin	4 × cryst., dialysiert, salzfrei Fluka A.G., CH-9470 Buchs
CM 32	Whatman, Springfield, U.K.

Coomassie	brilliant blue, G 250 rein Serva Feinbiochemika, D-6900 Heidelberg
Cryotubes	48 × 12.5 Nunc, durch Gibco Europe, Paisley, Scotland U.K.
Cyt c	from horse heart, type VI Sigma Chemical Company, St. Louis, Missouri U.S.A.
DABITC	purum Fluka A.G., CH-9470 Buchs
DE-32	Whatman, Springfield, U.K.
Dioxan	p.a. E. Merck, D-6100 Darmstadt
[³ H]Essigsäureanhydrid	Prod. #TRK.2 C3 Amersham International plc, Buckinghamshire, U.K.
[¹⁴ C]Essigsäureanhydrid	Prod. # CFA.340 Amersham International plc, Buckinghamshire, U.K.
Ethylacetat	Sequanal grade Pierce Eurochemie B.V., Holland
FCS	membrane filtered KC Biological, Lenexa, Kansas U.S.A.
Gelbond	PAG LKB Produkter, Bromma, Schweden
Glutaraldehyd	50 % in H ₂ O, pract. Fluka A.G., CH-9470 Buchs
Guanidin-HCl	Sequanal grade Pierce Eurochemie B.V., Holland
Heptan	zur Sequenzanalyse Fluka A.G., CH-9470 Buchs
HgCl ₂	cryst., Ph. H. V Siegfried A.G., CH-4800 Zofingen
Hydroxylamin	p.a. E. Merck, D-6100 Darmstadt
Hypoxanthin	cell culture tested Sigma Chemical Company, St. Louis, Missouri U.S.A.
ICFA	Difco Laboratories, Detroit, Michigan U.S.A.

IDMEM	Gibco Europe, Paisley, Scotland U.K.
Instand	Lumac, bezogen durch Kontron A.G., CH-8048 Zürich
125J	als NaJ, für Proteinmarkierung EIR, CH-5303 Würenlingen
KLH	Prod. # H 2133 Sigma Chemical Company, St. Louis, Missouri U.S.A.
Kontrogel	Szintillationsflüssigkeit Kontron A.G., CH-8048 Zürich
Methanol	pract. Kantonsapotheke
Mikrotiterplatten	Falcon 3911 Microtest III Beckton Dickinson, Oxnard, California U.S.A.
Na-acetat	purum Fluka A.G., CH-9470 Buchs
Na ₂ HPO ₄	p.a. E. Merck, D-6100 Darmstadt
NaH ₂ PO ₄	p.a. E. Merck, D-6100 Darmstadt
Na ₂ S ₂ O ₅	p.a. (Natriummetabisulfit; Natriumdisulfit) E. Merck, D-6100 Darmstadt
Ninhydrin	p.a. E. Merck, D-6100 Darmstadt
Papain	Type III, 2 × cryst. Sigma Chemical Company, St. Louis, Missouri U.S.A.
PEG 4000	für die Gaschromatografie E. Merck, D-6100 Darmstadt
Pepsin	cryst. Worthington
[¹⁴ C]Phenylalanin	Prod. # CFB.70 Amersham International plc, Buckinghamshire, U.K.
PITC	Sequanal grade Pierce Eurochemie B.V., Holland
Pristan	pract. EGA-Chemie, D-7924 Steinheim

Protein A	von Staph. aureus Pharmacia Fine Chemicals AB, S-75104 Uppsala
PVC-Röhrchen	48 × 5 mm Miljan Instruments S.A., CH-1207 Geneve
RARa/IgG(H+L)	Antiserum, lyophilisiert Nordic Immunologicals, Tilburg, Netherlands
RARa/IgG(Fc)	Antiserum, lyophilisiert Nordic Immunologicals, Tilburg, Netherlands
RARa/IgM(Fc)	Antiserum, lyophilisiert Nordic Immunologicals, Tilburg, Netherlands
SDS	krist., reinst Serva Feinbiochemika, D-6900 Heidelberg
Sephadex	alle verwendeten Porositätsgrade mit Korngrösse 'fine' Pharmacia Fine Chemicals AB, S-75104 Uppsala
Sepharose	CL-4B Pharmacia Fine Chemicals AB, S-75104 Uppsala
SnCl ₂	p.a. E. Merck, D-6100 Darmstadt
TFA	Sequanal grade Pierce Eurochemie B.V., Holland
Thermolysin	aus Bacillus thermoproteolyticus, 3 × cryst. Serva Feinbiochemika, D-6900 Heidelberg
Thymidin	cell culture tested Sigma Chemical Company, St. Louis, Missouri U.S.A.
Triethylamin	destilliert im Hause
Tris	research grade Serva Feinbiochemika, D-6900 Heidelberg
UF-C 5	Nuclepore, durch Sterico A.G., CH-8953 Dietikon
V-8-Protease	aus Staph. aureus Miles Laboratories Inc., research products division U.S.A.
Veronal	p.a. E. Merck, D-6100 Darmstadt

Wasserstoffperoxid	Perhydrol E. Merck, D-6100 Darmstadt
YM 2	Amicon Ltd., High Wycombe, Buckinghamshire U.K.
Zellkulturplatten	96-Loch Petra-Plastic, CH-7000 Chur
Zellkulturplatten	24-Loch Petra-Plastic, CH-7000 Chur
Zellkulturflaschen	25 cm ² Falcon 3013 F Beckton Dickinson, Oxnard, California U.S.A.
Zellkulturflaschen	75 cm ² Falcon 3034 F Beckton Dickinson, Oxnard, California U.S.A.
Zellkulturflaschen	150 cm ² Corning Glass Works, Corning, New York U.S.A.

Alle anderen Chemikalien wurden von der Firma Fluka mit dem Reinheitsgrad puriss. p.a. bezogen.

3. Abbildungen

Abbildung 1: Gesamtübersicht über das Modifikationsexperiment

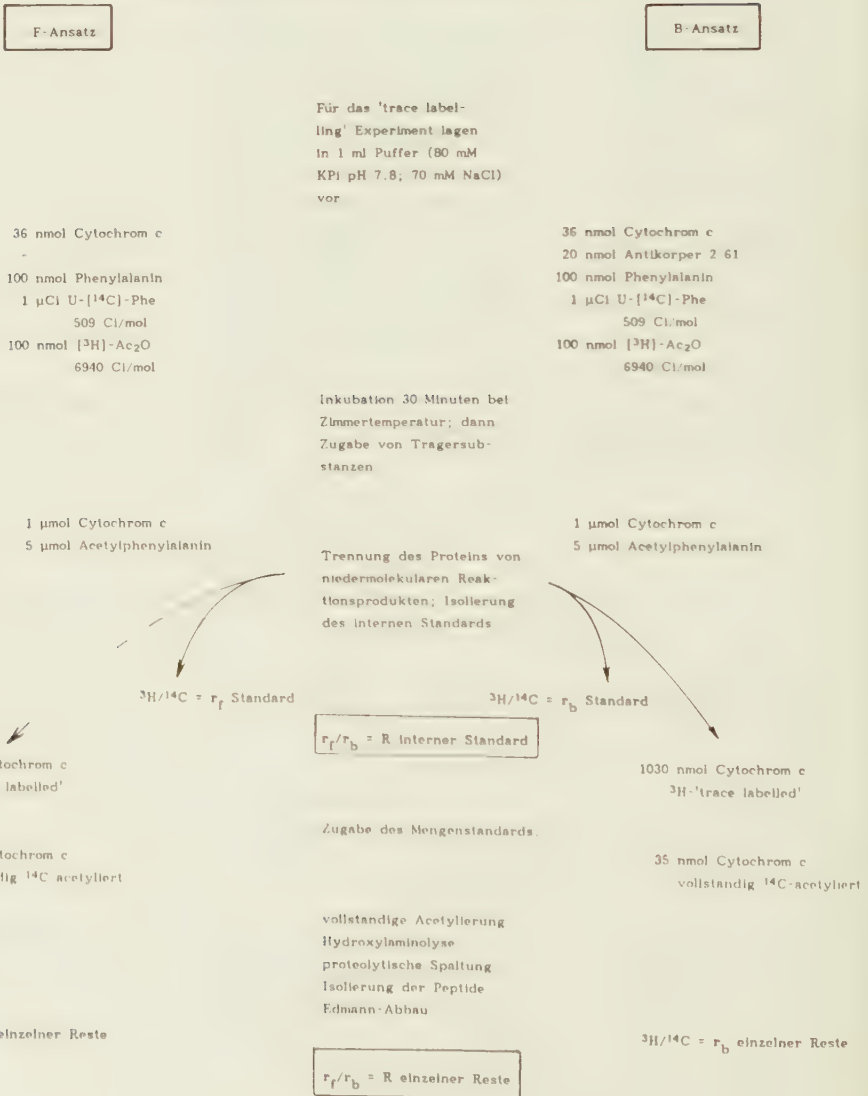
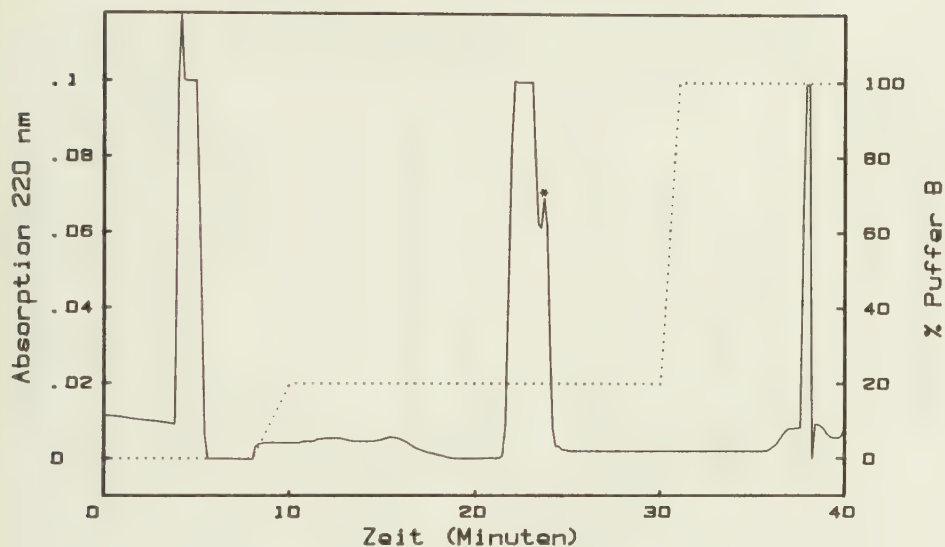


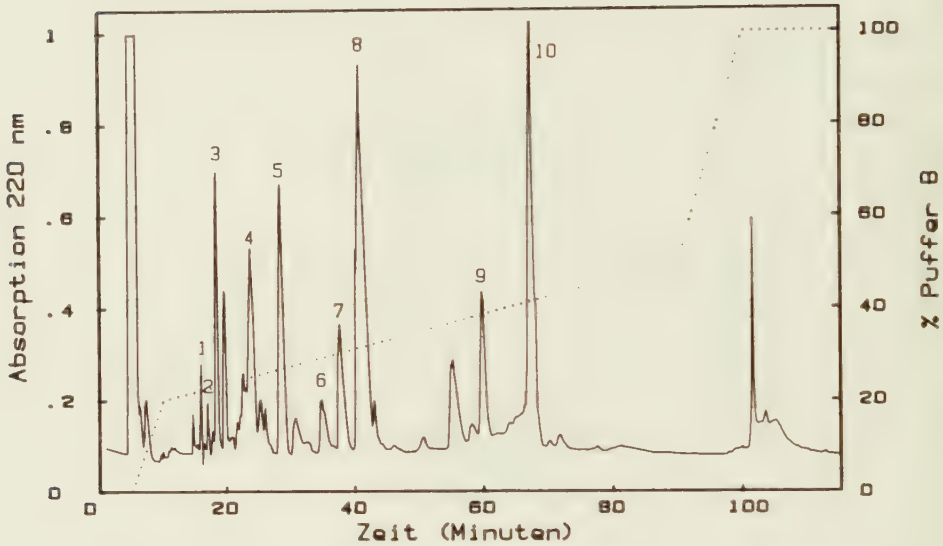
Abbildung 2: Abtrennung von N-Acetylphenylalanin durch HPLC



Legende:

Die Elutionsposition des N-Acetylphenylalanins ist mit * gekennzeichnet. Sie wurde durch Auftrag der entsprechenden Reinsubstanz bestimmt. Der Peak wurde vor der weiteren Verwendung durch Rechromatografie im gleichen Gradientensystem nachgereinigt.

Abbildung 3: HPLC-Elutionsprofil des chymotryptischen Verdaus von Pferde-Cytochrom c

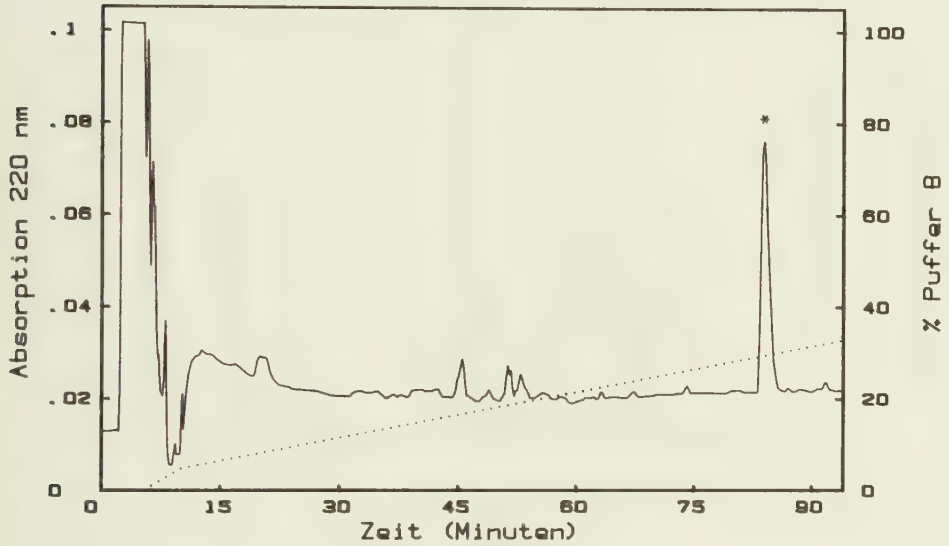


Legende:

Die durch Edmann-Abbau bestimmte Sequenz der Peptide ist angegeben. Zahlen in Klammern geben die Elutionsposition (% Puffer B) bei der Rechromatografie an.

1. K₉₉-T₁₀₂
2. T₁₉-G₂₃ (12.5 %)
3. K₂₅-K₂₇ (gemeinsam mit Peptid F₄₆-)
4. gemeinsam K₃₉-A₄₃ und I₇₅-K₇₉ (19.8 %)
5. L₆₈-K₇₃
6. A₈₃-K₈₈ (28.5 %)
7. K₆₀-T₆₃ (29.5 %)
8. K₅₅-W₅₉
9. G₁-F₁₀
10. V₁₁-K₁₃

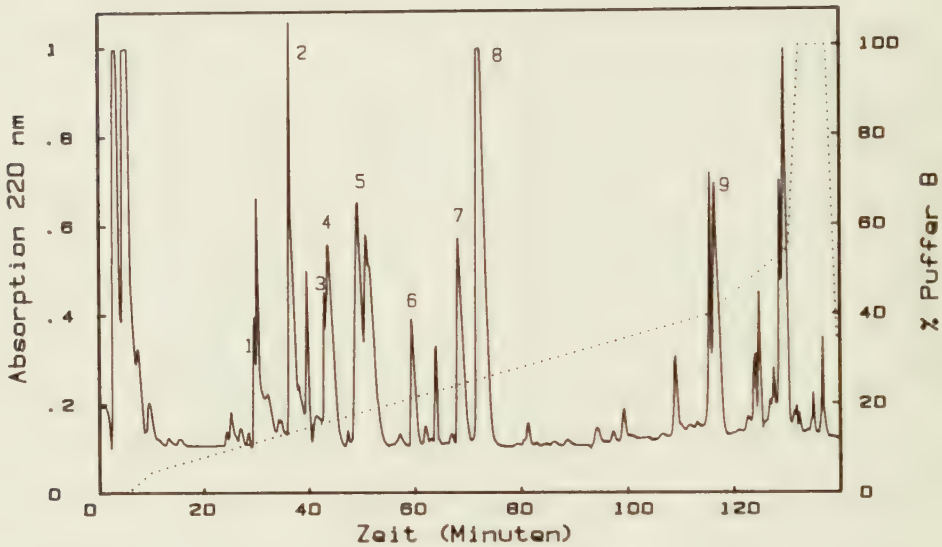
Abbildung 4: HPLC-Reinigung des V8-Protease-Verdaus von Peptid 1-10 von
Pferde-Cytochrom c (Peptid # 9 von Abb. 2)



Legende:

Der mit * bezeichnete Peak hat die Sequenz K₅-F₁₀

Abbildung 5: HPLC-Elutionsprofil des thermolytischen Verdaus von
Pferde-Cytochrom c

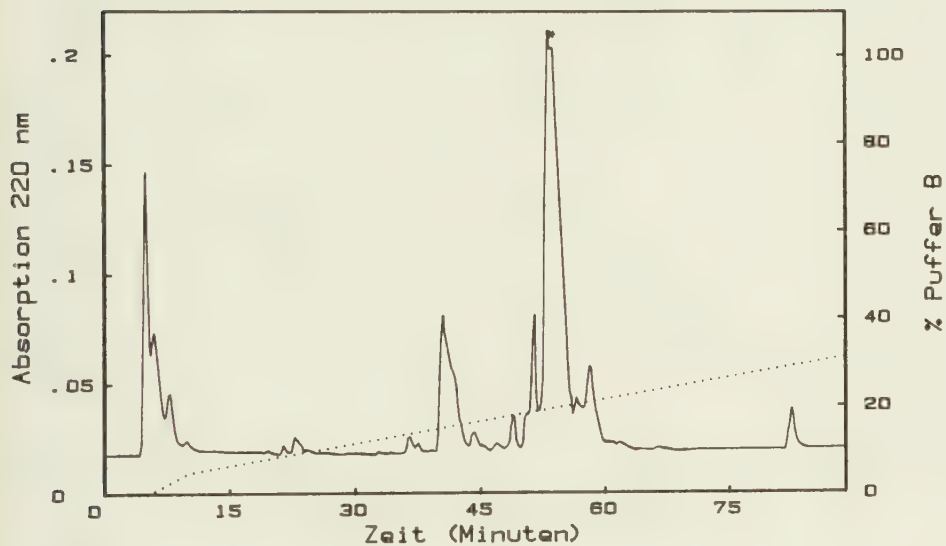


Legende:

Sequenzangaben in Klammern entstammen der Aminosäurenanalyse. Die übrigen Sequenzen wurden manuell bestimmt. Prozentzahlen in Klammern geben die Position des Peaks bei Rechromatografie an.

1. T₄₉-K₅₃
2. gemeinsam I₉₅-Y₉₇ und L₉₈-K₁₀₀
3. V₂₀-K₂₇
4. I₈₅-T₈₉ (15.2%)
5. L₆₈-K₇₃ (17.8%)
6. (G₁-K₈)
7. (T₇₄-M₈₀)
8. I₅₇-E₆₂
9. (V₁₁-K₂₇)

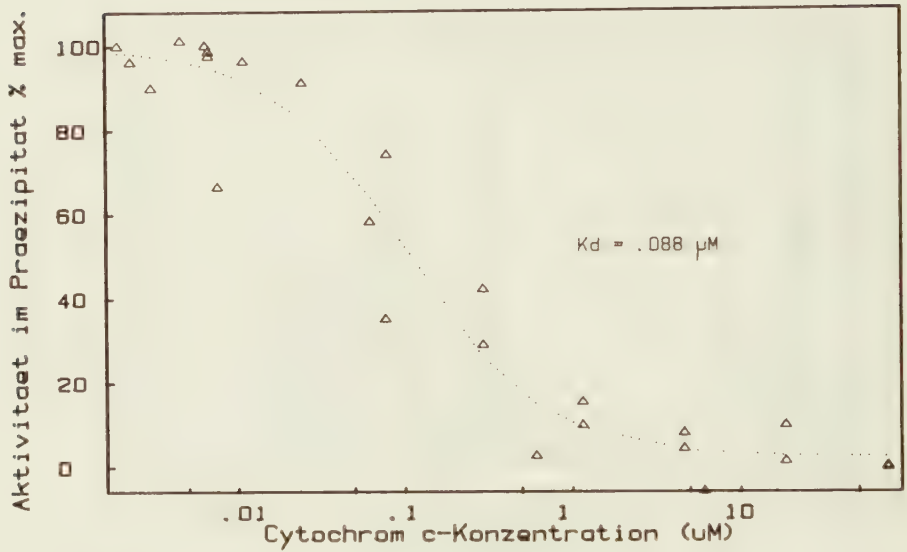
Abbildung 6: Rechromatografie über HPLC des Peptides # 4 von Abb. 3



Legende:

Der mit * bezeichnete Peak entspricht zwei Peptiden mit den Sequenzen K₃₉ - A₄₃ und I₇₅ - K₇₉

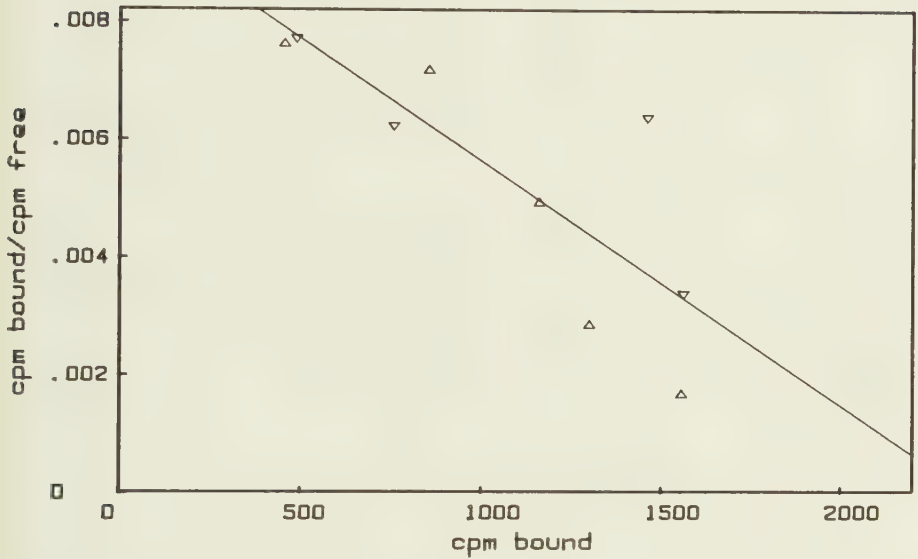
Abbildung 7: Diagramm der Bindungsdaten von Antikörper 2.61
im Farr-Test



Legende:

Die Bindungsdaten aus 3 Farr Tests sind aufgezeichnet. Durch rechnerischen Vergleich mit theoretischen Kurven für verschiedene Dissoziationskonstanten wurde dasjenige K_d ermittelt, welches die Originaldaten am besten wiedergibt. Die unspezifische Fällung wurde von allen Kurven subtrahiert. Die Aktivität im Pellet in Ansätzen ohne Zugabe 'kalten' Cytochroms c wurde als 100 % gesetzt.

Abbildung 8: Bindungsdaten der AG46-Klone, ermittelt mit dem
'solid-phase-RIA'



Legende:

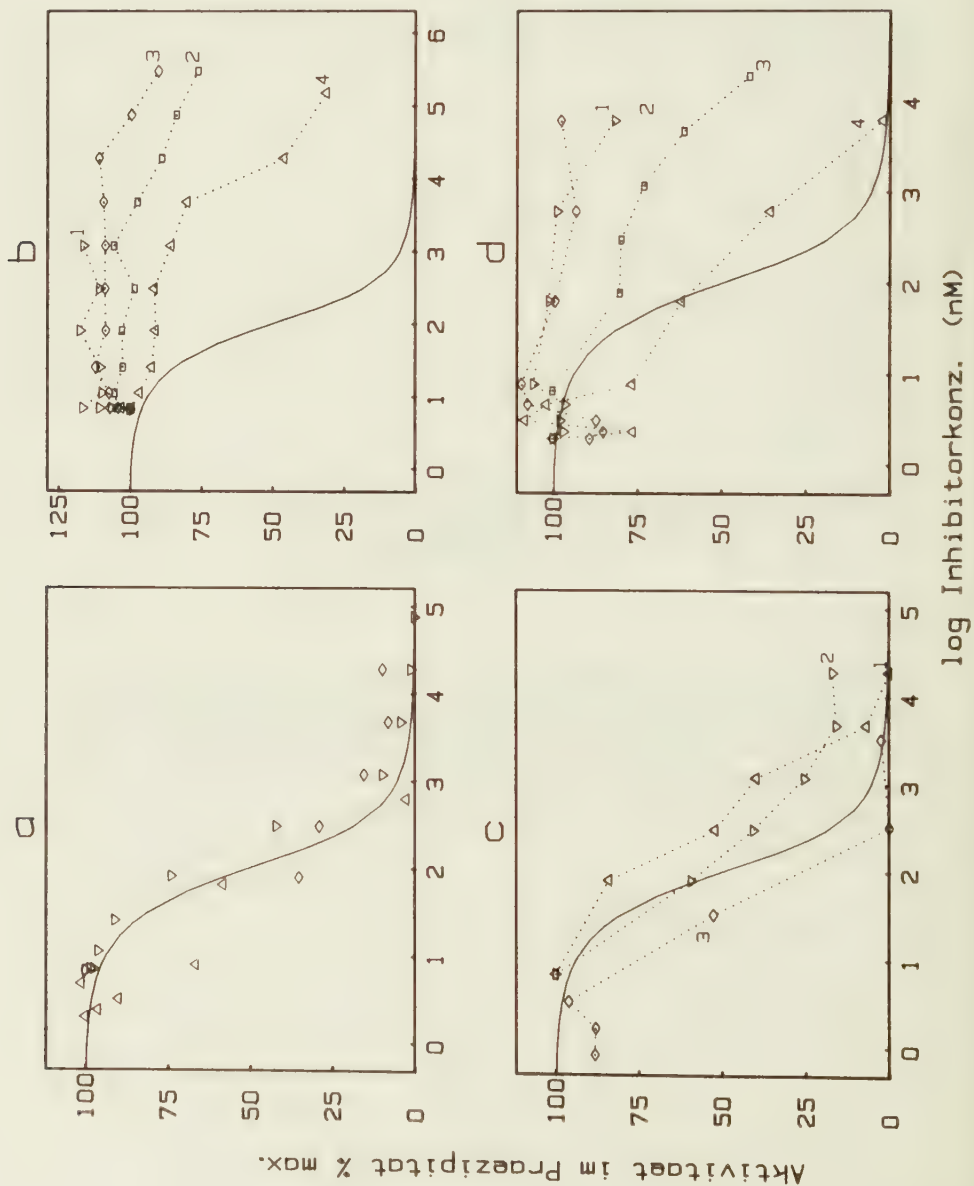
Aus den Bindungsdaten wurden für eine spezifische Aktivität des verwendeten Cytochroms c von 8.67×10^{16} cpm/mol folgende Werte ermittelt (die Messwerte für AG46-48 sind mit aufrechten, diejenigen für AG46-54 mit umgekehrten Dreiecken gekennzeichnet):

$$K_d = 4.16 \times 10^{-6} \text{ M}$$

$$\text{Menge Bindungsstellen pro well} = 2.72 \times 10^{-14} \text{ mol}$$

$$\text{Korrelationskoeffizient} = -.815$$

Abbildung 9: Konkurrenzexperimente von verschiedenen Cytochromen c und Cytochrom c - Derivaten mit Antikörper 2.61



Legende zu Abbildung 9:

a) Kompetitionsassays mit Pferdecytochrom c.

Die Daten aus 3 Experimenten, wovon eines mit PEG 6000, sind zusammengefasst. Die durchgezogene Kurve ist für einen K_d von $5 \cdot 10^{-8}$ M berechnet.

b) Kompetitionsassays mit verschiedenen Derivaten von Pferdecytochrom c

1. Apo-Cytochrom c
2. CNBr-Fragment 81-104
3. CNBr-Fragment 66-81
4. CNBr-Fragment 1-65

c) Kompetitionsassays mit differentiell modifizierten Partnern

1. desamidierte Pferdecytochrom c-Formen
2. differentiell modifizierter Antikörper 2.61, natives Cytochrom c
3. differentiell modifiziertes Cytochrom c, nativer Antikörper

d) Konkurrenz mit verwandten Cytochrom c verschiedener Spezies

1. Thunfisch
2. Hund
3. Kaninchen
4. Rind

Abbildung 10: Sequenzvergleiche verwandter Cytochrome c

C-terminale Aminosäuresequenz des Pferdecytochroms c

Sequenz-Nr.	55	60	65	70	75	80	85	90	95	100
AS-Code	---I---	I---	I---	I---	I---	I---	I---	I---	I---	I---
	NKNKGITWKEETLMEYLENPKKYIPGTRMIFAGIKKTEREDLIAYLKATNE									

Vergleich der ausgetauschten Aminosäuren

Sequenz-Nr.	54	58	60	61	62	88	89	92	95	100	103	104
Pferd	N	T	K	E	E	K	T	E	I	K	N	E
Rind	.	.	G	.	.	.	G	A	.	.	.	.
Hund	.	.	G	.	.	T	G	A	.	.	K	.
Kaninchen	.	.	G	.	D	.	D	A	.	.	.	.
Huhn	.	.	.	.	D	.	S	V	.	D	S	K
Taube	.	.	.	.	D	.	A	A	.	Q	A	K
Thunfisch	S	V	N	N	D	.	G	Q	V	S	S	-

Abbildung 11: Verhältnisswerte der r_f aus zwei Modifikationsexperimenten mit freiem Cytochrom c

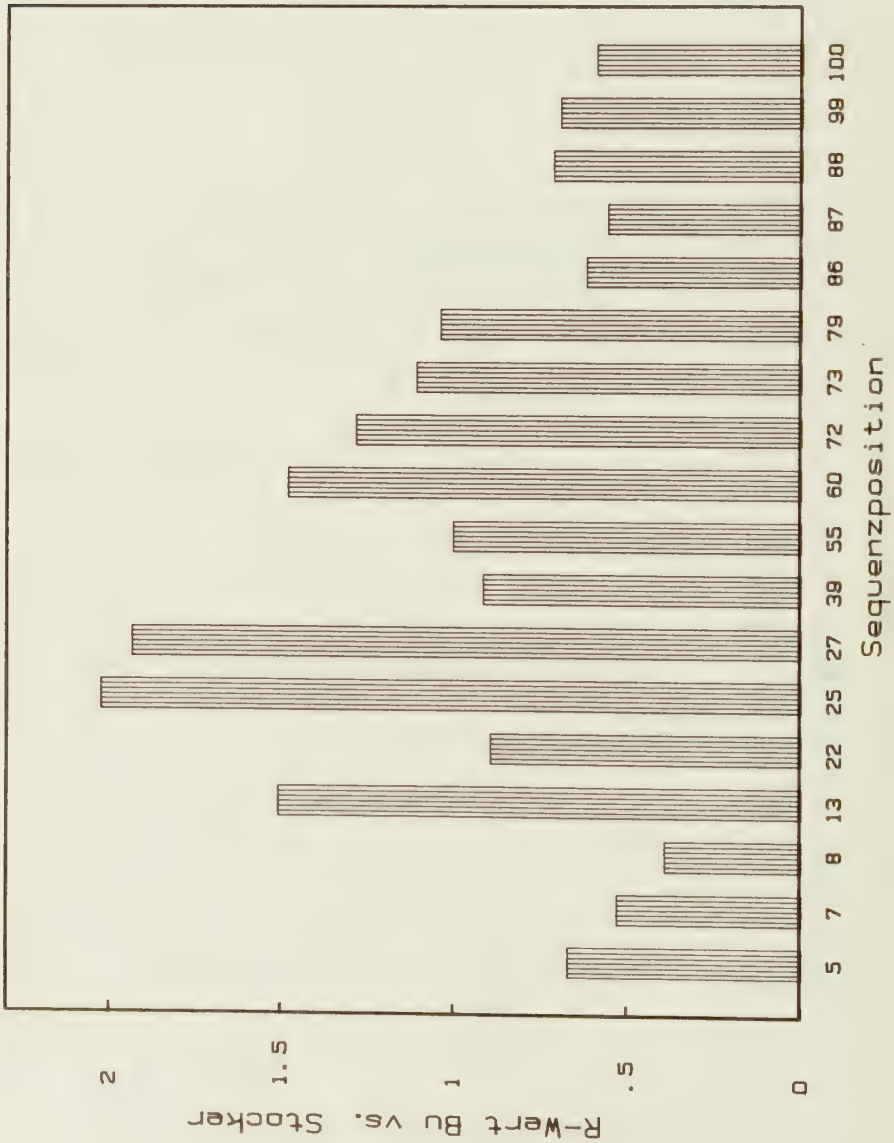


Abbildung 12: R-Werte der differentiellen Modifikation von Pferde-Cytochrom c mit Antikörper 2.61

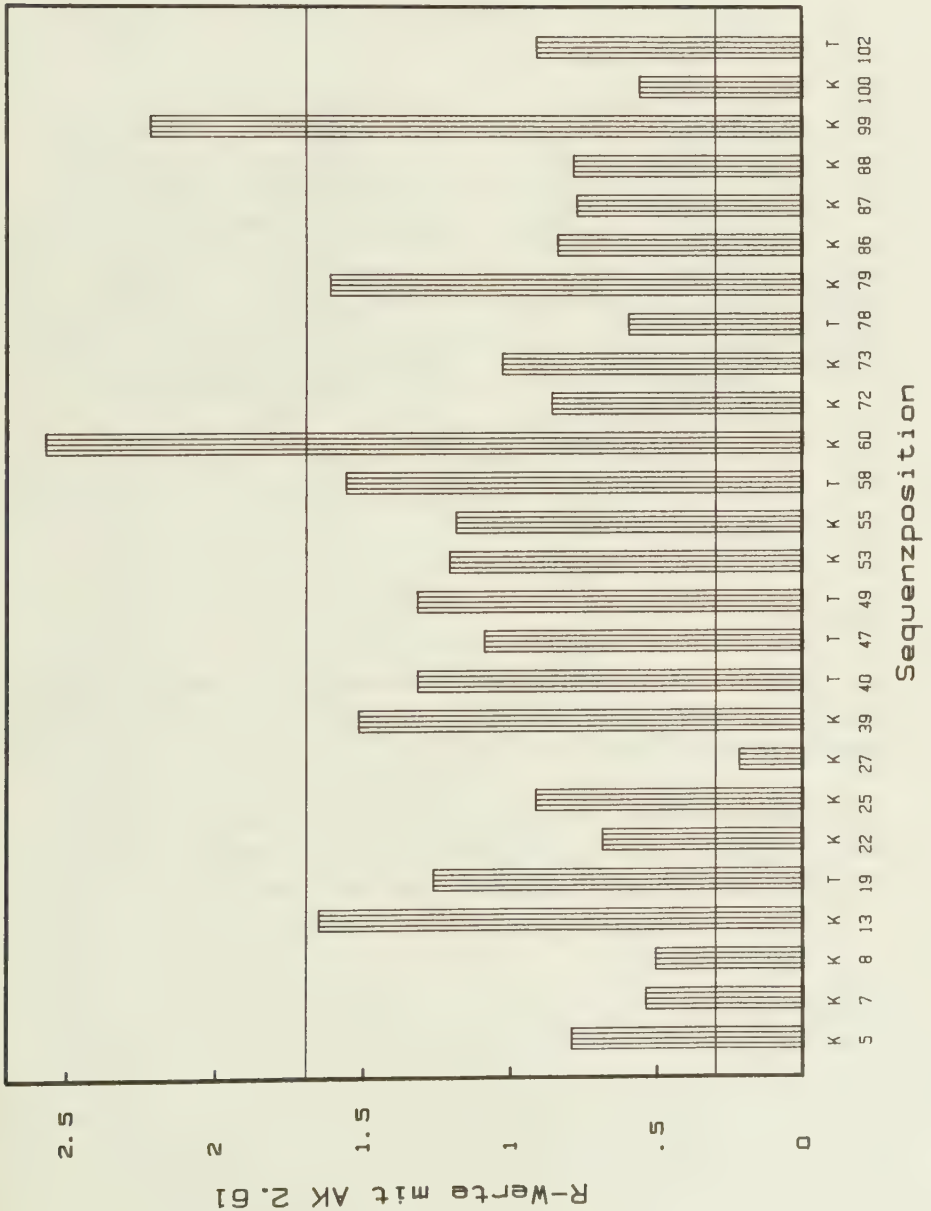
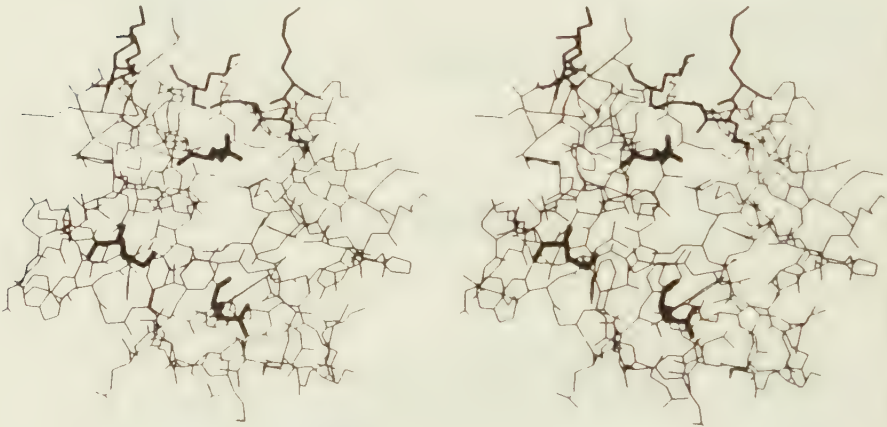


Abbildung 13: Röntgenstruktur von Thunfisch-Cytochrom c

Die zum Epitop gehörenden Reste sind fett gezeichnet



Legende:

Beim Thunfisch-Cytochrom c entspricht Gln 92 dem Glu 92, Asn 60 dem Lys 60 und Lys 99 dem Lys 99 des Pferde-Cytochroms c. Auf der Abbildung befinden sich Gln 92 oben, Asn 60 rechts und Lys 99 links.

Als Bezugspunkte für die Abstandsmessung wurden das ϵ -N von Lys 99, das δ -C von Gln 92 und γ -C von Asn 60 des Thunfischproteins verwendet. Das Haem wurde der Uebersichtlichkeit wegen nicht abgebildet.

4. Tabellen

TABELLE 1: Bindungseigenschaften der Cytochrom c-spezifischen Hybride

Antikörper Bezeichnung	Tierstamm×Myelom Immunisation mit	Bindung (cpm) an	
		Cytochrom c:	BSA:
ACC-AB16	Lou×F0	10340	7150
	nativ Cytochrom c		
ACC-AC50	Lou×F0	10010	7940
	nativ Cytochrom c		
ACC-AE50	Lou×F0	3510	1550
	nativ Cytochrom c		
ACC-AG95	Lou×F0	10110	6980
	nativ Cytochrom c		
ACC-AH19	Lou×F0	1730	510
	nativ Cytochrom c		
ACC-AH49	Lou×F0	9430	5230
	nativ Cytochrom c		
ACC-AI77	Lou×F0	860	270
	nativ Cytochrom c		
ACC-AG46	Lou×F0	6150	970
	nativ Cytochrom c		
ACC-DA4	Lou×F0	1580	440
	nativ Cytochrom c		
ACC-DB68	Lou×F0	9260	920
	nativ Cytochrom c		
ACC-DD56	Lou×F0	440	150
	nativ Cytochrom c		
AKO-EA7	Lou×F0	137	72
	KLH-Konjugat		
AKO-EA39	Lou×F0	75	39
	KLH-Konjugat		
ACC-FI42	Lou×F0	360	200
	nativ Cytochrom c		
2.61 Lau	SJL×P3X63-Ag8.653	15000	1200
	nativ Cytochrom c		

TABELLE 2: Bindungseigenschaften von Anti-Cytochrom c-Klonen

Klon Bezeichnung	Bindung (cpm) an Cytochrom c:	BSA:
ACC-AG46-48	9150	730
ACC-AG46-54	10800	780
ACC-DA4	*	*
ACC-DB68-5	1810	30
ACC-DB68-6	1040	50
ACC-DB68-10	1610	60
ACC-DD56	*	*
AKO-EA39	*	*
2.61 Lau	11700	320

* = keine besseren Klone als das Stamm-Hybrid (vgl. Tab. 1)

TABELLE 3: Kreuzreaktivität der Antikörper AG46-48 und AG46-54

Cytochrom c Spezies:	Bindung (cpm) mit Antikörper			C9-D5 ⁺
	2.61	AG46-48	AG46-54	
Rh. rubrum (C ₂)	300	4900	6200	300
Candida	700	12300	13100	600
Kaninchen	7100	8700	10900	300
Rind	11200	9400	12000	300
Pferd, desamid. ⁺⁺	14300	13900	13400	400
Pferd	14000	9000	10500	300
(positive Kontrolle)				
BSA	750	2700	4700	200
(negative Kontrolle)				

⁺ C5-D9 wurde als negative Kontrolle mitgeführt;
der Antikörper ist gegen Histokompatibilitäts-
antigene gerichtet.

⁺⁺ die desamidierten Formen, die bei der Reinigung
anfallen, wurden für den Test verwendet.

TABELLE 4: Kreuzreaktionen von Antikörper 2.61 Lausanne

Antigen	Konzentration bei 50 % Inhibition der ^{125}J -Cytochrom c Bindung (10^{-6} M)
Pferd	.010
Pferd, desamid.*	.010
Pferd, diff. modif.**	.011
Pferd, mit modif. AK***	.015
Pferd, apo	>75
Pferd, 1-65****	19
Pferd, 66-80****	>75
Pferd, 81-104****	>75
Rind	.012
Kaninchen	11
Hund	>11
Thunfisch	>11

* desamidierte Formen, die bei Ionentauscherchromatografie abgetrennt wurden

** Pferde-Cytochrom c, welches mit Essigsäureanhydrid in der für das 'trace labelling' verwendeten Menge modifiziert worden ist

*** Assay mit nativem Cytochrom c, aber unter Verwedung von AK 2.61, welcher differentiell modifiziert wurde

**** CNBr-Fragmente

TABELLE 5: Abschätzung des prinzipiellen Zählfehlers

Relativer Zählfehler in % des Verhältniswertes A/B
bei Zählung während 20 Minuten

dpm B	dpm A				
	500	1000	2000	5000	10000
50	14.5	14.3	14.8	17.1	21.1
100	11.9	11.5	11.5	12.4	14.1
200	10.6	10.0	9.7	9.9	10.6
500	10.0	9.0	8.6	8.4	8.5
1000	10.1	8.8	8.2	7.8	7.7

Background im Kanal A: 12 ± 1 cpm

Background im Kanal B: 7 ± 1 cpm

rel. Genauigkeit ESR : ± 0.2 %

rel. Genauigkeit ZA A: ± 1 %

rel. Genauigkeit ZA B: ± 1 %

rel. Genauigkeit SP A: ± 1 %

rel. Genauigkeit SP B: ± 1 %

Formeln:

$$\text{dpm A} = \frac{\text{ZA B} \cdot \text{cpm A} - \text{SP A} \cdot \text{cpm B}}{\text{ZA A} \cdot \text{ZA B} - \text{SP A} \cdot \text{SP B}} = {}^3\text{H-dpm}$$

$$\text{dpm B} = \frac{\text{ZA A} \cdot \text{cpm B} - \text{SP B} \cdot \text{cpm A}}{\text{ZA A} \cdot \text{ZA B} - \text{SP A} \cdot \text{SP B}} = {}^{14}\text{C-dpm}$$

Abkürzungen:

ZA A: Zählausbeute von ${}^3\text{H}$ in Kanal A (34 %)

ZA B: Zählausbeute von ${}^{14}\text{C}$ in Kanal B (55 %)

SP A: Zählausbeute von ${}^{14}\text{C}$ in Kanal A (10 %)

SP B: Zählausbeute von ${}^3\text{H}$ in Kanal B (1 %)

cpm : Netto-Zählrate im entsprechenden Kanal (abzüglich Background)

dpm : Zerfallrate des entsprechenden Isotops

TABELLE 6: $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ -Verhältnisse für die differentielle chemische Modifikation mit Antikörper 2.61

Rest	Sequenzposition	$^3\text{H}/^{14}\text{C}$ -Verhältnis F-Ansatz	$^3\text{H}/^{14}\text{C}$ -Verhältnis B-Ansatz
Lys	5	4.49	14.9
Lys	7	10.3	50.2
Lys	8	10.0	51.9
Lys	13	35.5	56.7
Thr	19	7.0	14.6
Lys	22	7.01	26.8
Lys	25	18.8	54.1
Lys	27	14.6	174
Thr	28	n.b. ⁺	n.b.
Lys	39	14.9	25.9
Thr	40	15.7	31.4
Thr	47	11.3	27.3
Thr	49	26.0	52.0
Lys	53	8.93	19.5
Lys	55	15.4	34.2
Thr	58	15.9	26.9
Lys	60	53.7	55.1
Thr	63	n.m. ⁺⁺	n.m.
Lys	72	34.3	105
Lys	73	16.1	41.2
Thr	78	8.2	36.1
Lys	79	18.1	29.6
Lys	86	8.8	27.6
Lys	87	10.1	34.2
Lys	88	6.87	23.0
Thr	89	n.m.	n.m.
Lys	99	4.25	5.05
Lys	100	6.03	28.3
Thr	102	9.65	27.9

⁺ nicht bestimmt

⁺⁺ nicht bestimmbar wegen tiefen dpm und/oder Kontamination mit Lys

Lebenslauf

Geboren am 11. Oktober 1956 in Zürich

1962 - 1968 Primarschule in Aesch (Maur)

1968 - 1975 Realgymnasium Rämibühl in Zürich, Abschluss

1975 Matura Typ B

1975 - 1981 Studium der Medizin an der Universität Zürich, Abschluss

1981 Staatsexamen in Zürich, anschliessend

1982 - 1983 als Assistenzarzt an der aargauischen Höhenklinik Barmelweid

1983 - 1984 17. Postgraduate Kurs der Universität Zürich, währenddessen

1985 Beginn der vorliegenden Arbeit, seit

1986 am Institut für medizinische Mikrobiologie der Universität
Zürich

